

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus**

**Die antioxidative Wirkung von
Cyclooxygenase-2-Hemmern gemessen an
Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marie-Therese Schuster
aus München

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter:

PD Dr. med. U. Harréus

Mitberichterstatter:

PD Dr. med. Thomas Herzinger

PD Dr. med. Udo Walther

Dekan:

**Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,
FACR, FRCR**

Tag der mündlichen Prüfung:

25.06.2009

Meinen geliebten Eltern

1	Einleitung.....	7
1.1	Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.....	7
1.1.1	Epidemiologie des Kopf-Hals-Karzinoms.....	7
1.1.2	Karzinogenese des Kopf-Hals-Karzinoms.....	7
1.1.2.1	Genetische Suszeptibilität.....	8
1.1.2.2	Onkogene.....	8
1.1.2.3	Tumorsuppressorgene.....	9
1.1.2.4	Exogene Risikofaktoren.....	10
1.2	Oxidative Schäden.....	11
1.2.1	Oxidative Schäden und Tumorgenese.....	11
1.2.2	Oxidative Schäden und Entzündung.....	12
1.3	Die Cyclooxygenase.....	12
1.3.1	COX-1.....	13
1.3.2	COX-2.....	13
1.3.3	Die Produkte der Cyclooxygenase und ihre Funktion.....	15
1.3.4	Mechanismen der Cyclooxygenase-Inhibition.....	16
1.3.5	COX-2 spezifische Inhibitoren: Celebrex [®] und Vioxx [®]	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Patientenkollektiv und Gewebeproben.....	19
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Miniorgankulturen.....	19
2.2.2	Präparation der Nasenmuschelschleimhaut.....	20
2.2.3	Kultivierung der Miniorgankulturen.....	21
2.2.4	Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel für die zu untersuchenden Substanzen.....	21
2.2.5	Ansatz A: Medikamenteninkubation mit Celebrex [®] in der Konzentration 0,1µg/ml und 1µg/ml und Induktion eines oxidativen Schadens mittels Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂).....	22
2.2.6	Ansatz B: Medikamenteninkubation mit Celebrex [®] in der Konzentration 0,1µg/ml und mit Vioxx [®] in der Konzentration	

	0,0125µg/ml und Induktion eines oxidativen Schadens mittels	
	Hydrogenperoxid (H₂O₂).....	25
2.2.7	Einzelzellisolierung.....	27
2.2.8	Vitalitätsbestimmung	27
2.3	Mikrogelelektrophorese (Comet Assay).....	28
2.3.1	Präparation der Objektträger.....	28
2.3.2	Lyse von Zell- und Kernmembranen.....	28
2.3.3	Elektrophorese.....	29
2.3.4	Digitale Analyse der DNA-Migration	29
2.4	Methodenspezifisches Material	31
2.4.1	Miniorgankulturen	31
2.4.2	Mikrogelelektrophorese	33
2.4.3	Geräte und Zubehör, Verbrauchsmaterial	35
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Statistische Analyse	37
3.2	Vitalitätstest	37
3.3	Induktion einer DNA-Schädigung durch Hydrogenperoxid	
	(H₂O₂).....	37
3.4	Analyse der antioxidativen Effekte von Celebrex[®] und Vioxx[®]	
	an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut.....	39
3.4.1	Genotoxizitätsmessung von Celebrex[®] in den Konzentrationen	
	0,1µg/ml und 1µg/ml an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut..	39
3.4.2	Genotoxizitätsmessung von Hydrogenperoxid (H₂O₂) an nasaler	
	Schleimhaut.....	41
3.4.3	Antioxidativer Effekt von Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg/ml	
	und 1µg/ml an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut.....	42
3.4.4	Genotoxizitätsmessung von Vioxx[®] (0,0125µg/ml) nach Einmal- und	
	Mehrfachgabe an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut	44
3.4.5	Genotoxizitätsmessung von Celebrex[®] (0,1µg/ml) nach Einmal- und	
	Mehrfachgabe an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut	45
3.4.6	Antioxidativer Effekt von Vioxx[®] an Miniorgankulturen nasaler	
	Schleimhaut.....	46

3.4.7	Antioxidativer Effekt von Celebrex [®] an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut.....	48
4	Diskussion	50
4.1	Auswahl der Patienten	50
4.2	Ausschluss genotoxischer Effekte der COX-2-Inhibitoren Celebrex [®] und Vioxx [®]	50
4.3	Genotoxizität von Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂).....	51
4.4	Festlegung der auf die Kopf-Hals-Karzinogenese Einfluss nehmenden Konzentration des Präparates Celebrex [®]	52
4.5	Die antioxidativen Effekte der COX-2-Inhibitoren Celebrex [®] und Vioxx [®]	54
4.6	Vergleich antioxidativer Effekte der COX-2-Inhibitoren nach einfacher und mehrmaliger Vorinkubation.....	56
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literatur	61
7	Anhang.....	78
7.1	Abkürzungen.....	78
7.2	Publikation	79
7.3	Danksagung.....	80
7.4	Lebenslauf	81

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

1.1.1 Epidemiologie des Kopf-Hals-Karzinoms

Legt man die Daten des saarländischen Krebsregisters zu Grunde, erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1998 ca. 347.000 Menschen an Krebs. Davon machten die Malignome des Kopf-Hals-Bereiches unter den Männern mit einer geschätzten altersstandardisierten Inzidenz von 24,5/100.000 einen Anteil von 6,3% aus und standen somit an vierter Stelle der Häufigkeitsverteilung aller Malignome der Männer.

Die rohen Mortalitätsraten für das Jahr 1999, die sich aus der jährlichen Anzahl der Todesfälle, bezogen auf 100.000 der Bevölkerung ergeben, lagen bei den Männern bei 12,3 und bei den Frauen bei 3,2. Verfolgt man die altersstandardisierte Mortalität über einen Zeitraum von 20 Jahren, so hat sich diese bei den Kopf-Hals-Malignomen wie bei keiner anderen Krebserkrankung verdreifacht (Schlesinger-Raab et al., 2003).

1.1.2 Karzinogenese des Kopf-Hals-Karzinoms

Die Karzinogenese der Kopf-Hals-Tumoren unterliegt einem „multistep process“, dem eine oder mehr Veränderungen des genetischen Materials zugrunde liegen (Califano et al., 1996). Histologisch gesehen entwickelt sich eine Hyperplasie über die Dysplasie zum Carcinoma in situ, um dann anschließend in ein invasives Karzinom überzugehen (Hunter et al., 2005). Eine wichtige Theorie in diesem Zusammenhang ist die „field cancerization“ Theorie. Sie basiert auf Beobachtungen, dass Karzinome multifokal auf Gebieten mit präkanzerösen Veränderungen entstehen und sich ausbreiten. Diese Gebiete können makroskopisch unsichtbar sein oder als Leukoplakie imponieren. Grundlage dazu sind histologische und genetische Untersuchungen, die abnormales Gewebe rund um ein Karzinom zeigten und somit belegten, dass Noxen auf die gesamte Schleimhaut einwirken (Kotelnikov et al., 1996).

1.1.2.1 Genetische Suszeptibilität

Zu der Exposition gegenüber karzinogener Substanzen kommt noch die jeweilige genetische Prädisposition, die von Individuum zu Individuum variiert, da z. B. nicht jeder Raucher im Laufe seines Lebens an einem Tumor erkrankt. Eine große Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Mutagensensitivität, d.h. die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. Schantz und Hsu zeigten 1989 bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen eine, durch die mutagene Substanz Bleomycin induziert, erhöhte Anzahl an DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Schantz und Hsu, 1989). Auch der Polymorphismus metabolisierender Enzyme, die für den Abbau verschiedenster Karzinogene zuständig sind, wie die Glutathion-S-Transferase (Trizna et al., 1995) und das Cytochrom P450-System (Hong und Yang, 1997), ist maßgeblich an der Karzinomentstehung beteiligt.

Ebenso begünstigen fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen, wie z.B. der Polymorphismus im Reparaturgen XRCC1 (Sturgis et al., 1999) die Entstehung von Malignomen.

1.1.2.2 Onkogene

Wichtig in der Karzinogenese des Kopf-Hals-Karzinoms ist die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen, woraus unkontrollierte Wachstums- und Zelldifferenzierungsprozesse resultieren.

Mutationen in ras-Onkogenen, bestehend aus H-, K-, und N-ras Genen, scheinen in Zusammenhang mit Kopf-Hals-Karzinomen zu stehen. Mit einer Inzidenz von 35% wurden H-ras Mutationen in oralem Plattenepithelkarzinom in Indien identifiziert (Saranath et al., 1991). Auch die Amplifikation und/oder Überexpression von myc-Onkogenen, bestehend aus c-, N-, und L-myc, sind maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt (Rodrigo et al., 1996).

Untersucht wurden auch die Onkogene, die sich auf Chromosom 11q13 befinden, wie int-2, hst-1, cyclin D1/PRAD-1.

Int-2 und hst-1 Gene sind zuständig für die Induktion von Zellproliferation und Angiogenese (Hardisson, 2003). Amplifikationen wurden in 30-50% der Kopf-Hals-Karzinome gefunden (Berenson et al., 1989; Muller et al., 1997).

Cyclin D1 ist auf dem CCND1/PRAD-1 Gen kodiert und kontrolliert die G1 Phase im Zell-Zyklus. Eine Überexpression von Cyclin D1 führt zu einer Verkürzung der G1-Phase und reduziert die Abhängigkeit der Zellen von mitogenen Substanzen (Hardisson, 2003). Eine Amplifikation im Cyclin D1 Gen wurde in 26-39% (Meredith et al., 1995) und eine Überexpression in 39-64% der Fälle von Kopf-Hals-Karzinom gefunden (Akervall et al., 1997).

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches unter anderem den *epidermal growth factor* (EGF) und den *transforming growth factor* (TGF α) bindet. Die Aktivierung von EGFR induziert eine Autophosphorylierung und schließlich die Aktivierung von ras (Hackel et al., 1999). Das EGFR Gen zeigt häufig eine Überexpression in oralen Malignomen (Partridge et al., 1988) und auch das Vorhandensein von Mutationen im EGFR scheint besonders mit einer schlechten Prognose bei Kopf-Hals-Karzinomen, vor allem bei Larynx-tumoren zu korrelieren (Miyaguchi et al., 1990).

COX-2 steht mit vielen Onkogenen in Verbindung. Nimmt man das EGFR als Beispiel, so zeigte sich, dass eine Aktivierung von EGFR zu einem gesteigerten COX-2-Level und folglich auch zu einer gesteigerten Prostaglandinkonzentration führt (Coffey et al., 1997).

1.1.2.3 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene (TSG) fungieren als Übermittler negativer Wachstumssignale und sind damit an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt (Weinberg, 1991).

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erfolgt meist durch Punktmutationen, Deletionen und Umordnung auf beiden Allelen (Yokota und Sugimura, 1993; Vogelstein und Kinzler, 1993). Dieser sog. „loss of heterozygosity“ (LOH) wurde bei Kopf-Hals-Karzinomen hauptsächlich auf den Chromosomen 3p, 5q, 8p, 9p/q, 11p und 17p nachgewiesen. Diese Regionen beinhalten die Tumorsuppressorgene wie VHL (3p), p16 (9p) und p53 (17p) (Glavac et al., 2003; Ah-See et al., 1994).

Ein weiteres wichtiges Tumorsuppressorgen, welches den Zell-Zyklus reguliert und Apoptose induziert ist das Retinoblastom-Gen, lokalisiert auf Chromosom 13 (Jefferies und Foulkes, 2001).

Ein Zusammenhang zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und der COX-2 wurde u. a. von Leung et al. untersucht. Es wurde bei Patienten mit Magentumoren gezeigt, dass in Tumoren mit sog. *Missense-Mutationen* des p53, d.h. Punktmutationen mit dem Austausch einer Aminosäure, eine stärkere COX-2 Expression stattfindet, als in Tumoren ohne Mutation (Leung et al, 2001).

1.1.2.4 Exogene Risikofaktoren

Zu den Hauptrisikofaktoren für die Genese von Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt gehören Tabak- und Alkoholkonsum, wobei gerade die Kombination von Rauchen und Alkoholkonsum das Risiko zu erkranken noch weiter erhöht (Castellsague et al., 2004).

Mehr als 50 karzinogene Stoffe wurden im Zigarettenrauch nachgewiesen. Die wichtigsten darunter sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), Nitrosamine und aromatische Amine (Hecht, 1999). Jedoch zählt nicht nur das Rauchen von Tabak zu den Risikofaktoren, auch der orale Genuss von Tabak (Kautabak) gilt als karzinogen (Johnson, 2001). Im Alkohol sind es hauptsächlich Ethanolmetabolite, wie das Acetaldehyd, welche karzinogenes Potential aufweisen (Boffetta und Hashibe, 2006). Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Malignomen spielt auch die Infektion mit Viren. Diskutiert werden unter anderem das Humane Papilloma Virus (HPV) und zwar hauptsächlich HPV Typ 16 und das Epstein-Barr-Virus. HPV beweist onkogenes Potential durch die Kodierung von den Onkoproteinen E6 und E7, welche ihrerseits wiederum die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb inaktivieren (Herrero et al., 2003). Auch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus ist nachweislich an der Genese der Kopf-Hals-Karzinome beteiligt (Shimakage et al., 2002).

Weiterhin gehört auch eine ungenügende, einseitige Ernährung, wie ebenso eine mangelnde Mundhygiene zu den Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Malignomen (Winn et al., 1991).

1.2 Oxidative Schäden

1.2.1 Oxidative Schäden und Tumorgenese

Als Konsequenz eines aeroben Lebens, greifen täglich ca. 10.000-20.000 Sauerstoffradikale (*reactive oxygene species*, ROS) jede Zelle im Körper an (Valko et al., 2004). Eine Überproduktion an ROS entweder endogen, durch verschiedene metabolische Prozesse oder exogen, durch zahlreiche Xenobiotika zugeführt, bezeichnet man als „oxidativen Stress“ (Valko et al., 2006).

Sauerstoffradikale sind definiert als Moleküle oder molekulare Fragmente, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthalten und dadurch eine außerordentliche Reaktionsfreudigkeit aufweisen (Winterbourn, 1993). Wichtige Sauerstoffradikale sind das Superoxidradikal, das Hydroxylradikal und das Peroxylradikal (Valko et al., 2004)

Oxidative Schäden, die durch Radikale verschiedenster Art verursacht werden, führen zu DNA-Veränderungen bzw. DNA-Läsionen und erfordern eine ständige Modifikation des genetischen Materials. Diese Modifikationen können einen ersten Schritt in der Tumorentstehung darstellen (Valko et al., 2006). ROS induzierte DNA-Schäden beinhalten Einzel- und Doppelstrangbrüche, Purin-, Pyrimidin-, Desoxyribose-Modifikationen und DNA *cross-links*. Weiterhin können sie auch die Transskription, Signaltransduktionswege, Replikationsfehler und Genominstabilität induzieren, welche alle mit Karzinogenese assoziiert sind (Marnett, 2000; Cooke et al., 2003).

Die oxidative DNA-Schädigung *in vivo*, wird in der vorliegenden Arbeit durch die Inkubation der Miniorgankulturen mit Hydrogenperoxid imitiert.

Unter physiologischen Bedingungen haben die Zellen die Möglichkeit mit einem endogenen Abwehrsystem, die anfallenden ROS abzufangen. Zum Abwehrsystem gehören die Superoxiddismutase, welche das Superoxidradikal neutralisiert, die Gluthationperoxidase, zuständig für Hydrogenperoxid und die Katalase, ebenso zuständig für das Hydrogenperoxid (Klaunig und Kamendulis, 2004).

Neben dem endogenen System existieren noch zahlreiche antioxidativ wirksamen Substanzen, wie z.B. Vitamin E, Vitamin C, Coenzym Q und Betacarotin, die entstehende freie Radikale abfangen (Clarkson und Thompson, 2000). Inwieweit COX-2-Inhibitoren antioxidative Wirkungen im Kopf-Hals-Bereich besitzen, ist bisher weitgehend ungeklärt.

1.2.2 Oxidative Schäden und Entzündung

Ein wichtiger Effekt der ROS an Zellen ist u.a. auch die oxidative Modifikation von membranständigen Fettsäuren, im Sinne einer Lipoperoxidation. Diese Oxidation nimmt einen schädigenden Einfluss auf die Fluidität der Membran, der Proteinstruktur und der Zell-Signal-Wege und führt zu einer gesteigerten Aktivität der Phospholipase A₂ (Balboa und Balsinde, 2006). Eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase A₂ beinhaltet ihrerseits eine gesteigerte Freisetzung der Arachidonsäure aus membrangebundenen Phospholipiden und diese wiederum, durch COX-1/COX-2 vermittelt, eine erhöhte Prostaglandinsynthese, welche maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Balboa und Balsinde, 2006).

In entzündetem Gewebe konnte man, sowohl in vivo (Hamilton et al., 1999) als auch in vitro (Saunders et al., 1999) eine höhere Konzentration an Prostaglandinen messen, wenn die Phospholipase A₂ aktiviert war.

1.3 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase, auch bekannt als „Prostaglandin-H-Synthase“ oder „Prostaglandinendoperoxid-Synthase“ besteht aus einer *epidermal growth factor* ähnlichen Domäne, einer Membranbindungsdomäne und einer katalytischen Domäne. Die katalytische Domäne beinhaltet eine Peroxidase-aktive Seite und eine Cyclooxygenase-aktive Seite (Simmons et al., 2004). Die Cyclooxygenase existiert in Isoenzymen, wobei die wichtigsten die COX-1 und die COX-2 sind.

Beide Isoenzyme sind im Lumen der Zellkernhülle und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Simmons et al., 2004). Die Isoenzyme der Cyclooxygenase sind membrangebundene Hämoproteine, welche als Oxygenase die Umwandlung von Arachidonsäure, ein Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen, zu Prostaglandin G₂ und als Peroxidase die Umwandlung von Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ katalysieren (Kam und See, 2000). Prostaglandin H₂ wird daraufhin durch gewebständige Synthasen in eine Vielzahl anderer Prostaglandine, Prostazykline oder Thromboxane umgewandelt, wie PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ und Thromboxan (TX₂) (Simmons et al., 2004).

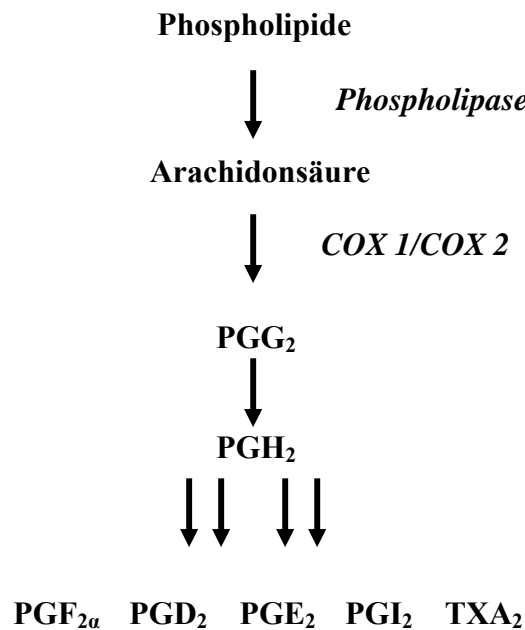


Abbildung 1. Schema zur Arachidonsäure-Kaskade

1.3.1 COX-1

Unter physiologischen Bedingungen wird die COX-1 in den meisten Säugetier-Zellen exprimiert (Turini und DuBois, 2002). Sie ist ein Hämoglykoprotein mit einem Gewicht von ca. 70 kD und erstmalig entdeckt und gereinigt aus Rindern (Miyamoto et al., 1976) und aus Schafen (Hemler und Lands, 1976). Besonders große Mengen der COX-1 befinden sich in Epithelzellen, Tubuluszellen der Niere und in Thrombozyten. Gerade in Thrombozyten, die einen Vorrat an COX-1 führen, hat sie die wichtige Funktion der Thromboxansynthese und somit der Blutstillung (Schafer, 1995).

Die COX-1 ist als „Housekeeping“ Enzym weitgehend zuständig für die Homöostase der Prostaglandine und die Gewährleistung eines Basislevels (DuBois et al., 1998).

1.3.2 COX-2

Dass auch eine induzierbare Form der Cyclooxygenase existiert, wurde in den 90er Jahren beobachtet. Fu et al., registrierten erhöhte Cyclooxygenase-Aktivität nachdem sie Monozyten bakteriellem Lipopolysaccharid ausgesetzt hatten (Fu et al., 1990).

Zahlreiche Studien folgten, bis Fletcher et al. und O'Banion et al. ein induzierbares Cyclooxygenase-Gen in Zellen vorweisen konnten, welches für ein Protein mit Cyclooxygenase-Aktivität kodierte (Fletcher et al., 1992; O'Banion et al., 1992). Dieses ist heute bekannt als die induzierbare COX-2. COX-2 ist wie COX-1 ca. 70 kD schwer. Studien über die Tertiärstruktur zeigten, dass die Aminosäure-Sequenz für die Substratbindungsstellen und die katalytischen Regionen nahezu identisch mit COX-1 sind. Es existieren jedoch auch Unterschiede, beispielsweise befindet sich in der Aminosäure-Sequenz an der Stelle 434 und 523 ein Isoleucin in COX-1 und ein Valin in COX-2. Für COX-2 ergibt sich daraus eine längere und flexiblere Substratbindungsstelle (Kurumbail et al., 1996; Picot et al., 1994).

Das Cyclooxygenase-2 Gen, welches hauptsächlich als „Response-Gen“ fungiert, wird durch verschiedene intra- und extrazelluläre Substanzen zur Expression von COX-2 stimuliert (Mitchell und Warner, 1999). Wichtig sind Entzündungsmediatoren, wie Interleukin 1 α , Interleukin 6, *tumor necrosis factor- α* und bakterielles Endotoxin (Geng et al., 1995).

Im Zusammenhang mit der COX-2 Expression stehen weiterhin Wachstumsfaktoren, wie u.a. der *epidermal growth factor* (Hamasaki und Eling, 1995), der Thrombozyten-Wachstumsfaktor (Xie und Herschman, 1996) ebenso wie lokal wirksame Metaboliten, z.B. wie Endothelin (Hughes et al., 1995) und 5-Hydroxytryptamine (Stroebel und Goppelt-Struebe, 1994). Auch der Thrombozyten-Aktivierungsfaktor (Bazan et al., 1994) und zirkulierende Hormone, wie Parathormon (Tetradis et al., 1996) steigern die COX-2 Expression. Obwohl die COX 2 hauptsächlich induzierbar ist, finden sich auch dauerhafte, niedrige Konzentrationen im Gehirn, der Niere und dem Uterus während der Gravidität (DuBois et al., 1998).

Zahlreiche Mechanismen in der Karzinogenese werden durch COX-2 beeinflusst. So kann COX-2 mit ihrer Peroxidase-aktiven Seite „Prokarzinogene in Karzinogene“ umwandeln (Marnett et al., 1978; Eling et al., 1990). Auch in der Angiogenese zeigt die COX-2 Wirkung. VEGF-Expression und Tumor-Vaskularisation korreliert mit der COX-2 Menge (Gallo et al., 2001). Ebenso nimmt die Invasivität eines Tumors mit steigender COX-2 Expression und damit steigender Prostaglandinmenge zu (Tsuji et al., 1997). Abschließend gilt ein chronischer Entzündungsreiz, welcher eine gesteigerte Prostaglandin-Produktion beinhaltet, u.a. auch als Risikofaktor für die Genese von Karzinomen (Weitzman und Gordon, 1990). Diese Untersuchungen begründen die in

der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen im Hinblick auf eine anti-karzinogene Wirkung der COX-2-Inhibitoren.

1.3.3 Die Produkte der Cyclooxygenase und ihre Funktion

Die Funktionen der Prostaglandine sind vielseitig. Prostaglandin E₂ und Prostaglandin I₂ sind maßgeblich beteiligt an Entzündung und können durch die Sensibilisierung von Nozizeptoren zu Schmerzen führen (Stock et al., 2001). PGE₂ kann nach Freisetzung im Hypothalamus Fieber induzieren (Cao et al., 1998). Weiterhin zeigen Prostaglandine im Gastrointestinaltrakt zytoprotektive Wirkungen. PGE₂ und PGI₂ reduzieren die Sekretion von Magensäure (Simmons et al., 2004), wirken vasodilatatorisch auf die Magenschleimhautgefäße und fördern die Sezernierung des viskösen Mukus (Johansson und Kollberg, 1979). Im kardiovaskulären System führt PGI₂ nur zu einer Gefäßdilatation im Gegensatz zu PGE₂ und PGF_{2α}, welche sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation induzieren können (Simmons et al., 2004). Einen potenten Vasokonstriktor stellt auch das Thromboxan dar, das v.a. in Thrombozyten gebildet wird. Auch in der Angiogenese ist PGE₂ indirekt durch die Induktion des *vascular epidermal growth factor* (VEGF) beteiligt. Zu den durch Prostaglandinen beeinflussten Organsystemen bzw. Funktionen gehören weiterhin noch die Atemwege, die in Gegenwart von PGF_{2α}, TXA₂ und PGD₂ kontrahieren, während sie in Gegenwart von PGE₂ und PGI₂ dilatieren sowie die reproduktiven Prozesse, wie z.B. die Ovulation (Simmons et al., 2004).

In vielen maligne transformierten Geweben, Kopf-Hals-Karzinome eingeschlossen, kann eine erhöhte Prostaglandin-Produktion beobachtet werden (Bennett et al., 1980; Rigas et al., 1993). Diese erhöhte Prostaglandin-Produktion scheint im Zusammenhang mit einer erhöhten COX-2-Expression zu stehen, da diese, u.a. als Antwort auf Wachstumssignale, in der Pathogenese von Entzündungen und maligner Transformation mit einer gesteigerten Prostaglandin-Produktion reagiert (Dixon, 2003).

1.3.4 Mechanismen der Cyclooxygenase-Inhibition

Die Inhibition der Cyclooxygenase wird durch den Einsatz nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR) erreicht, welche in „nicht selektive“ und „COX-2-selektive“ NSAR unterteilt werden. Dabei bilden die Inhibitoren (NSAR) einen Komplex mit dem Enzym (COX) indem sie an der Cyclooxygenase-aktiven Seite des Enzyms binden. Diese Bindung verhindert die Reaktion mit dem eigentliche Substrat, der Arachidonsäure (Munroe und Lau, 1995; DeWitt, 1999) (siehe Abb. 2).

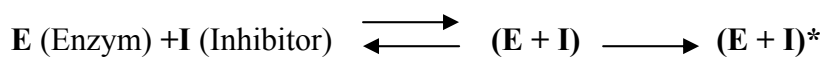


Abbildung 2. Schema zur Cyclooxygenase-Inhibition

Die meisten „nicht-selektiven NSAR“ inhibieren die COX über zwei Schritte. In einem ersten Schritt wird ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex (E+I) gebildet, welcher die Enzyme (COX-1 und COX-2) zunächst nur kompetitiv hemmt, d.h. der Inhibitor hat zwar eine höhere Affinität zu den Enzymen als das eigentliche Substrat, er bewirkt jedoch keine Konformationsänderungen in den Enzymen und kann durch eine Zunahme des Substrates wieder aufgehoben werden (Kurumbail et al., 2001). Das NSAR Ibuprofen ist ein Beispiel für einen kompetitiven Inhibitor. In einem zweiten Schritt, welcher Sekunden bis Minuten dauert, wird ein Komplex gebildet, in dem der Inhibitor sehr dicht an das Enzym bindet (E+I)*. Dieses ist der zeitabhängige Schritt in der Cyclooxygenase-Inhibition. Zu den „zeitabhängigen“ Inhibitoren gehört u.a. Indomethacin (Marnett und Kalgutkar, 1999).

Die Enzym-Aktivität der COX-2-spezifischen Inhibitoren verläuft anfangs ähnlich wie bei den nicht-selektiven NSAR. Zunächst bildet der Inhibitor eine reversible, kompetitive Bindung sowohl mit COX-1 als auch mit COX-2 (Walker et al., 2001). Die eigentliche Selektivität der COX-2 Inhibitoren wird jedoch erreicht durch einen nachfolgenden zeitabhängigen Schritt, bei dem im Verlauf von einigen Minuten ein dichter Komplex ausschließlich mit der COX-2 in einer nonkompetitiven Bindung gebildet wird. Die COX-2 Hemmer bewirken dabei keine kovalente Modifikation des Enzyms, d.h. es entsteht eine reversible Bindung (Isakson, 2003).

1.3.5 COX-2 spezifische Inhibitoren: Celebrex[®] und Vioxx[®]

Die oralen COX-2 Inhibitoren Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib) und Vioxx[®] (Wirkstoff Rofecoxib) sind lipophile, neutrale Moleküle, mit einer begrenzten Wasserlöslichkeit (Isakson, 2003). Die Medikamente zeigen eine gute Absorptiongeschwindigkeit im Gastrointestinaltrakt. Beide haben im Plasmaspiegel, im Anschluss an eine Einzeldosis, nach zwei bis maximal vier Stunden ein Maximum erreicht (Davies et al., 2000; Scott und Lamb, 1999). Der Metabolismus von Celecoxib verläuft über die hepatische Transformation in Hydroxyl- und Carboxylsäuren und Glucuronid-Derivate. Die oxidative Metabolisierung läuft über das Cytochrom P₄₅₀ 2C9 Isoenzym. Rofecoxib wird zunächst von einer cytosolischen Reduktase, hauptsächlich in der Leber, metabolisiert. Im weiteren Verlauf erfahren diese Metabolite eine hepatische Biotransformation zu Carboxylsäuren und Glucuronid-Derivaten (Isakson, 2003). Celecoxib wurde 1999 in den USA erstmals zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen, welche mit rheumathoider Arthritis und mit Osteoarthritis in Zusammenhang standen, und jüngst auch zur Therapie der Dysmenorrhoe, zugelassen. Rofecoxib wurde ebenso für die symptomatische Therapie der Osteoarthritis, für die Behandlung akuter Schmerzen, der Dysmenorrhoe und zuletzt auch der rheumathoiden Arthritis zugelassen (Isakson, 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zur Darstellung der Auswirkung von COX-2-Inhibitoren auf die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich wurden die nachfolgenden Fragestellungen jeweils mittels *Comet Assay* untersucht:

- Ausschluss genotoxischer Effekte der Präparate Celebrex[®] und Vioxx[®] auf Miniorgankulturen humaner Frischbiopsate von Nasenschleimhaut, sowohl nach einmaliger wie mehrfacher Inkubation.
- Bestimmung der für die DNA-Protektion wirksamsten Konzentration des Präparates Celebrex[®].
- Messung antioxidativer Effekte von COX-2-Inhibitoren.
- Vergleich antioxidativer Effekte von COX-2-Inhibitoren nach einmaliger und mehrfacher Vorinkubation.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Das Patientenkollektiv umfasste im Ansatz A 10 Patienten im Alter von 31-75 Jahren, deren durchschnittliches Alter 41,3 Jahre betrug. Hierbei waren drei Patienten weiblich und sieben Patienten männlich. Der Ansatz B beinhaltete 20 Patienten im Alter von 18–60 Jahren, deren durchschnittliches Alter 38,8 Jahre betrug. In diesem Kollektiv waren sieben Patienten weiblich, 13 Patienten männlich.

Die Patienten litten an einer Nasenatmungsbehinderung im Rahmen einer Nasenmuschelhyperplasie und unterzogen sich aus diesem Grund in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München einer Teilresektion der Concha nasalis inferior (Conchotomie). Die dabei anfallenden makroskopisch gesunden Operationsresektate dienten als Gewebeproben.

Nach Entnahme wurden die Frischbiopsate in steriler physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt und mit einer Verzögerung von maximal fünf Stunden in das Labor transportiert. Dort kam es dann zur sofortigen Verarbeitung und Versuchsbeginn.

Das Einverständnis der Patienten zur wissenschaftlichen Verwendung der Gewebeproben wurde präoperativ nach einem ärztlichen Aufklärungsgespräch eingeholt und die Untersuchungen wurden gemäß Ethikkommissionsantrag 221/04 genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Miniorgankulturen

Steinsvag et al. berichteten erstmalig über Miniorgankulturen des respiratorischen Epithels. Hierbei wurden Fragmente von adenoide Gewebe in nichtadhäsive, stationäre Organkulturen überführt. Im Verlauf der Kultivierung, welche insgesamt 40 Tage dauerte, konnte die Ausbildung eines rekonstruierten, mehrreihigen Epithels mit Zilientätigkeit beobachtet werden (Steinsvag et al., 1991). Eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen an Nasenschleimhaut wurde von Kleinsasser et al. entwickelt, in welchen es ermöglicht wurde, mehrfache in-vitro-

Inkubationen mit Xenobiotika durchzuführen (Kleinsasser et al., 2001). In diesen dreidimensionalen Organkulturen zeigt sich innerhalb sechs bis sieben Kulturtagen ein vollständiges respiratorisches Epithel, welches aus zwei bis drei Zellreihen besteht. Weiterhin bestehen neben einer Basalmembran sezernierende Becherzellen und auch zielentragende Epithelzellen. Miniorgankulturen stellen ein in-vitro-Modell der Kultivierung respiratorischen Epithels dar, in welchem es Zellen ermöglicht wird, in einem vitalen Zellverband zu leben. Im Gegensatz zur Kultivierung von Einzelzellen finden hier verschiedenste Zell-Zell-Interaktionen weiterhin statt und es kann dadurch eine in-vivo Situation nachgeahmt werden. Des Weiteren ermöglichen Miniorgankulturen in einem in-vitro-Modell eine Inkubation, wenn erwünscht auch repetitiv, mit genotoxischen und potentiell genoprotektiven Substanzen mit humanen Zellen in ihrem epithelialen Verband (Wallner et al., 2005).

2.2.2 Präparation der Nasenmuschelschleimhaut

Die Nasenmuschelschleimhaut wurde mit dem Skalpell unter sterilen Arbeitsbedingungen (Sterilbank) auf einer Petrischale vorsichtig von unbrauchbarem, anhängendem Knochen- und Bindegewebe abpräpariert. Im Anschluss wurden kleine ca. 1mm³ Stücke geschnitten, die nach dreimaligem Reinigen mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) auf 24-Well-Platten aufgebracht wurden. Pro Well ging ein Mukosastück mit 250µl Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM, Nährmedium) in Kultur. Die Platten waren zuvor mit sterilem 1,5% Agar Noble beschichtet worden. Der Agar wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gegeben, welcher mit fötalem Kälber Serum (FCS), nicht essentiellen Aminosäuren, Fungizone, Penicillin und Streptomycin versetzt war.

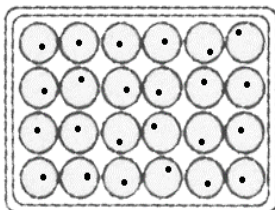


Abbildung 3. 24-Well-Platte mit Miniorgankulturen

2.2.3 Kultivierung der Miniorgankulturen

Die Mukosastücke wurden im Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit zu Miniorganen kultiviert, welche sich durch ein rekonstruiertes mehrreihiges Epithel mit Zilientätigkeit auszeichneten.

Nach 48 Stunden erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Am siebten Tag, der auch den Abschluss des Kultivierungsprozesses darstellte, wurden die Miniorgane auf frische 24-Well-Platten umgesetzt.

Zur Kontrolle der Vitalität und zum Ausschluss etwaiger bakterieller oder fungoider Infektionen wurden die Platten während des gesamten Kultivierungsprozesses unter einem inversen Mikroskop inspiziert.

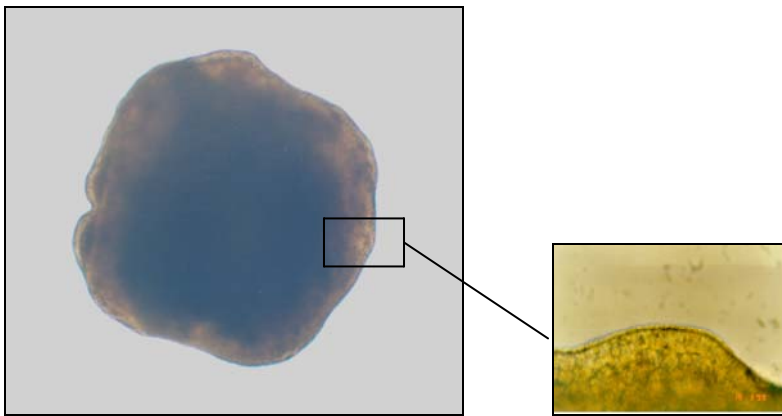


Abbildung 4. Miniorgankultur nach einwöchiger Kultivierungsphase, inverses Mikroskop x50; Bildausschnitt: zilientragendes Epithel x400

2.2.4 Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel für die zu untersuchenden

Substanzen

Als Lösungsmittel für die Cyclooxygenase-2-Hemmer wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) gewählt. Zahlreiche Studien, wie auch die von Tunez et al. beschäftigten sich mit einer antioxidativen Wirkung von DMSO (Tunez et al., 2005).

In Vorversuchen, welche der eigentlichen Versuchsanordnung vorgeschaltet wurden, wurde ein antioxidativer Effekt von DMSO auf die DNA von Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut untersucht. Dabei wurden die Miniorgankulturen sowohl einfach wie auch fünffach mit DMSO vorinkubiert und im Anschluss jeweils mit H₂O₂ versetzt.

Nach Vergleich mit ausschließlich mit H₂O₂ inkubierten Miniorgankulturen konnte statistisch signifikant gezeigt werden, dass sowohl eine einfache, wie auch mehrfache Inkubation mit DMSO in unserer Versuchsanordnung keinen Einfluss auf die DNA hat. Eine anioxidative Wirkung von DMSO auf die DNA von Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut ist somit nicht nachweisbar.

2.2.5 Ansatz A: Medikamenteninkubation mit Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg/ml und 1µg/ml und Induktion eines oxidativen Schadens mittels Hydrogenperoxid (H₂O₂)

Nach Abschluss der Kultivierung (Tag 7) begann die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Da es nicht gelang die Reinstoffe, Celecoxib und Rofecoxib zu erhalten, wurden die Versuche mit den Präparaten Celebrex[®] und Vioxx[®] durchgeführt.

25µl des Medikaments Celebrex[®], Wirkstoff Celecoxib 100mg/Kaps., wurden nach Auflösen in Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die 24-Well-Platten gegeben. Getestet wurde Celebrex[®] in zwei Konzentrationen, 0,1µg/ml und 1µg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank wurde die Substanz durch zweimaliges Reinigen mit BEGM wieder entfernt.

Ein Teil der Miniorgankulturen wurde, zum Ausschluss genotoxischer Effekte durch Celebrex[®] selbst, ausschließlich mit dem Medikament in beiden Konzentrationen inkubiert. Der andere Teil der Miniorgankulturen wurde, neben der Medikamentenbehandlung, am Tag 11 zusätzlich einer oxidativen DNA-Schädigung mittels H₂O₂ unterworfen. Dabei wurden 25µl von H₂O₂ (gelöst in Aqua bidest.) zu den entsprechenden Miniorgankulturen pipettiert und 15 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Endkonzentration von H₂O₂ lag bei 1 mM. Im Anschluss wurden auch sie zweimal mit BEGM gereinigt.

Um Negativkontrollen zu erhalten wurde ein Teil der Miniorgankulturen ausschließlich mit DMSO versetzt.

Weiterhin wurden einige Miniorgankulturen am Tag 11 ausschließlich mit H_2O_2 behandelt und dienten somit der Ermittlung einer Ausgangsschädigung. (Übersicht in Abb.5)

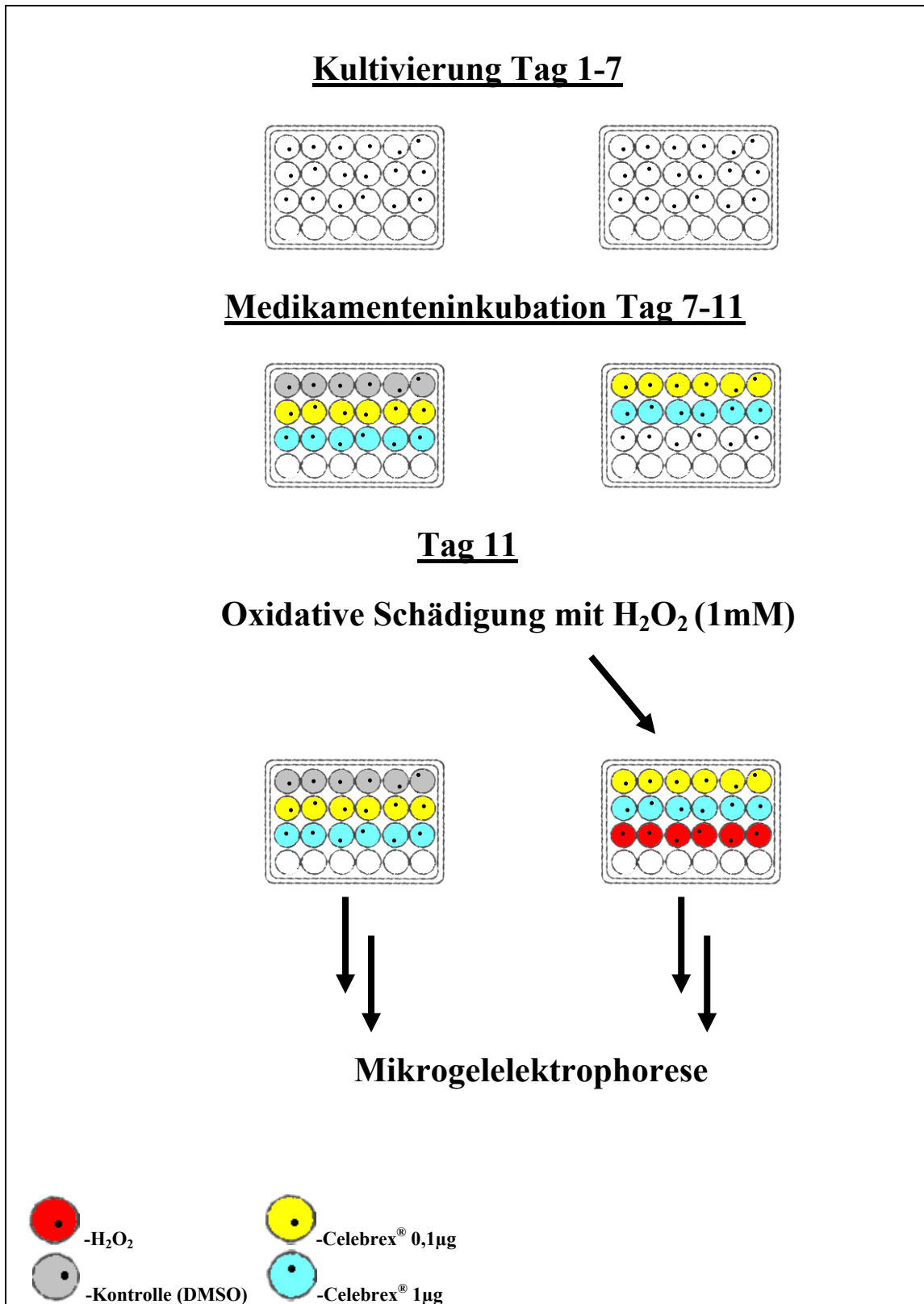


Abbildung 5. Schema für die Medikamenteninkubation mit Celebrex[®] in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml.

2.2.6 Ansatz B: Medikamenteninkubation mit Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg/ml und mit Vioxx[®] in der Konzentration 0,0125µg/ml und Induktion eines oxidativen Schadens mittels Hydrogenperoxid (H₂O₂)

Die Medikamenteninkubation begann für Ansatz B ebenso an Tag 7. Dabei wurden erneut 25µl Celebrex[®] und nun auch 25µl Vioxx[®], Wirkstoff Rofecoxib 12,5 mg/Tabl., nach Auflösen in DMSO, auf die 24-Well-Platten gegeben. Die Endkonzentration für Celebrex[®] war 0,1µg/ml pro Well und bei Vioxx[®] 0,0125µg/ml pro Well. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank, wurden die Substanzen durch zweimaliges Reinigen mit BEGM wieder entfernt.

Auch hier wurde die erste Hälfte der Miniorgankulturen, zum Ausschluss einer Genotoxizität durch die Medikamente selbst, ausschließlich mit den Medikamenten inkubiert. Wobei die Kulturen in einer ersten Versuchsanordnung, am Tag 7-11 und in einer zweiten Versuchsanordnung ausschließlich an Tag 11 mit den Medikamenten versetzt wurden.

Die zweite Hälfte der Miniorgankulturen wurde, wie im Ansatz A, neben der Medikamentenbehandlung, am Tag 11 zusätzlich einer oxidativen DNA-Schädigung mittels H₂O₂ zugeführt. Dabei wurden 25µl H₂O₂ (gelöst in Aqua bidest) zu den entsprechenden Miniorgankulturen gegeben und 15 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Endkonzentration von H₂O₂ lag bei 1mM. Im Anschluss wurden sie zweimal mit BEGM gereinigt.

Als Negativkontrollen erhielten einige Miniorgankulturen ausschließlich DMSO und für die Ermittlung einer Ausgangsschädigung erhielten einige Miniorgankulturen am Tag 11 ausschließlich H₂O₂. (Übersicht in Abb.6)

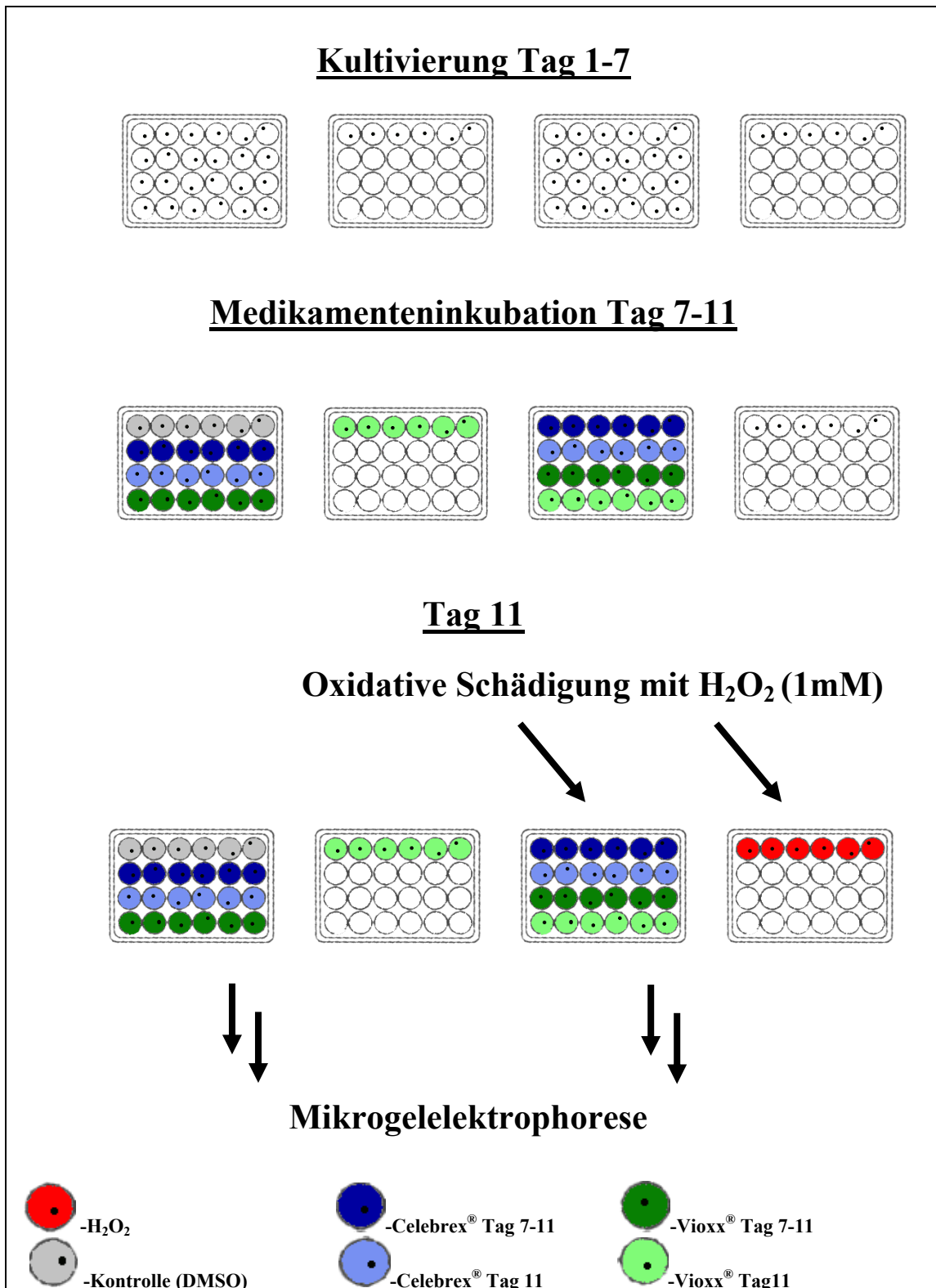


Abbildung 6. Schema für die Medikamenteninkubation mit Celebrex[®] und Vioxx[®].

2.2.7 Einzelzellisolierung

Für den Gewinn von Einzelzellen an Tag 11 der Kultivierung, nach Medikamenteninkubation und ggf. oxidativer Schädigung, wurde ein Enzymgemisch, bestehend aus 50mg/ml Protease, 10mg/ml Collagenase und 10mg/ml Hyaluronidase, gelöst in 10ml BEGM, verwendet.

Das Enzymgemisch wurde sterilfiltriert und 600µl in ein Eppendorf®-Gefäß vorgelegt. Nach Einbringen von zwei Miniorganen pro Gefäß, wurden diese 45 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Um zusätzliche DNA-Schäden durch einfallendes UV-Licht zu verhindern, wurde nach der Inkubationsphase unter Rotlicht gearbeitet.

Durch Rütteln der Eppendorf®-Gefäße mittels Minischüttler trennten sich Einzelzellen von bindegewebigen Bestandteilen und konnten dann mit einer sterilen Kanüle aus dem Gefäß entfernt werden. Zur Neutralisation der Enzyme wurden 600µl fötales Kälberserum (FCS) in die Zellsuspension eingebracht. Im Anschluss wurden die Eppendorf®-Gefäße bei 800U/min (Rotorradius 21,1 cm) und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, 1000µl des Überstandes abpipettiert und 1000µl 4°C kaltes *Phosphate Buffered Saline* (PBS) zugegeben, der Gefäßinhalt wurde durchgemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Reinigungsvorgang wiederholte sich einmal. Im Anschluss wurde der Überstand erneut abpipettiert und die Zellpellets der Mikrogelelektrophorese oder dem Vitalitätstest zugeführt.

2.2.8 Vitalitätsbestimmung

Zur Kontrolle der Vitalität wurde der Trypan-Ausschlusstest eingesetzt. Dabei kam jeweils ein Zellpellet der entsprechenden Versuchsreihen zum Einsatz. Die Trypanblaulösung wurde zu gleichen Teilen mit der Zellsuspension vermischt. Ein Tropfen davon wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Mikroskop (400fache Vergrößerung) beurteilt. Vitale Zellen, deren Zellmembran noch intakt ist, werden bei dieser Methode nicht angefärbt, avitale Zellen hingegen erscheinen blau. Nach Ermittlung der Gesamtzahl und der Zahl der avitalen Zellen, wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen errechnet.

2.3 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Die alkalische Version der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) wurde erstmals von Oestling und Johanson als Einzelzell Mikrogelelektrophorese entwickelt (Oestling und Johanson, 1984). Dieses Verfahren, von Singh et al. und Harréus et al. modifiziert, ermöglicht den Nachweis genotoxischer Effekte auf die DNA. Hierbei können beispielsweise Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA Crosslinks und inkomplette Exzisionsreparaturstellen nachgewiesen werden (Singh et al., 1988; Harreus et al., 1999). Nach einer induzierten DNA Schädigung mittels verschiedenster genotoxischer Substanzen entsteht eine DNA-Fragmentierung, die sich nach Durchführung der Elektrophorese in einem kometenähnlichen Bild mit intakter DNA im „Kopf“ und geschädigter DNA im „Schweif“ des Kometen präsentiert. (siehe Abb.7)

2.3.1 Präparation der Objektträger

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den speziell angefertigten, an den Längsseiten mattierten Objektträgern zu erreichen, erfolgte eine Beschichtung mit 85µl 0,5% Normal Melting Agarose. Zur Aushärtung wurden die Objektträger mindestens 48 Stunden vor Verwendung gelagert.

Jedes Zellpellet wurde in 75µl 0,7% Low Melting Agarose resuspendiert und auf die vorpräparierten Objektträger aufgetragen. Mit einem Deckglas versehen, kamen sie zur Aushärtung auf eine gekühlte Metallplatte. Nach ca. 10 Minuten wurde das Deckglas abgenommen und mit weiteren 85µl 0,7% Low Melting Agarose beschichtet. Im Anschluss an eine erneute Aushärtungsphase wurde das Deckglas abgezogen.

2.3.2 Lyse von Zell- und Kernmembranen

Um die DNA freilegen zu können mussten zunächst die Zell- und Kernmembranen aufgelöst werden. Dies geschah mittels eines Lysepuffers. Die Objektträger wurden vertikal in eine Färbekammer gestellt, welche im Anschluss mit 100ml Lysepuffer aufgefüllt wurde. Nach einer Verweildauer von einer Stunde bei 4°C wurde die Elektrophorese durchgeführt.

2.3.3 Elektrophorese

Die Objektträger wurden horizontal, nahe der Anode, in einer gekühlten Elektrophoresekammer positioniert. Anschließend wurde die Kammer mit 4°C kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt und die Objektträger damit vollständig bedeckt.

Während der 20 minütigen Inkubation im alkalischen Milieu, kam es zur Denaturierung und Entspiralisierung der DNA. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Elektrophorese gestartet (25V, 300mA, 20 Minuten). Anschließend wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und auf einer Färbebrücke dreimal mit 400mM Trisma-Base neutralisiert. Zur Anfärbung der DNA wurde auf alle Objektträger 75µl des Protein-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid gegeben. Bis zur Auswertung der Objektträger, erfolgte die Aufbewahrung in angefeuchteten Objektträgerkästen im Kühlschrank.

2.3.4 Digitale Analyse der DNA-Migration

Um das Ausmaß der DNA-Schädigung auf den jeweiligen Objektträgern zu ermitteln, wurde ein DMLB Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera und digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1) eingesetzt (siehe Abb.7). Dabei wurden jeweils 40 Zellen pro Objektträger, also insgesamt 80 Zellen pro Ansatz, ausgewertet. DNA-Fragmente, welche durch Einzelstrangbrüche entstehen, zeigen im elektrischen Feld ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Dabei wandern Fragmente umso schneller und somit weiter, je stärker die DNA geschädigt wurde. Im Mikroskop wird ein kometenähnliches Bild sichtbar, wobei sich die weitgehend intakte DNA im „Kopf“ und die zerstörte DNA im „Schweif“ des Kometen abbildet. Um das Maß der Schädigung quantifizieren zu können, wurde der Olive Tailmoment verwendet, welcher das Produkt aus der mittleren DNA-Wanderungsstrecke und dem Anteil der DNA im Kometenschweif in Relation zur Gesamt-DNA einer Zellen angibt (Olive und Banath, 1993).

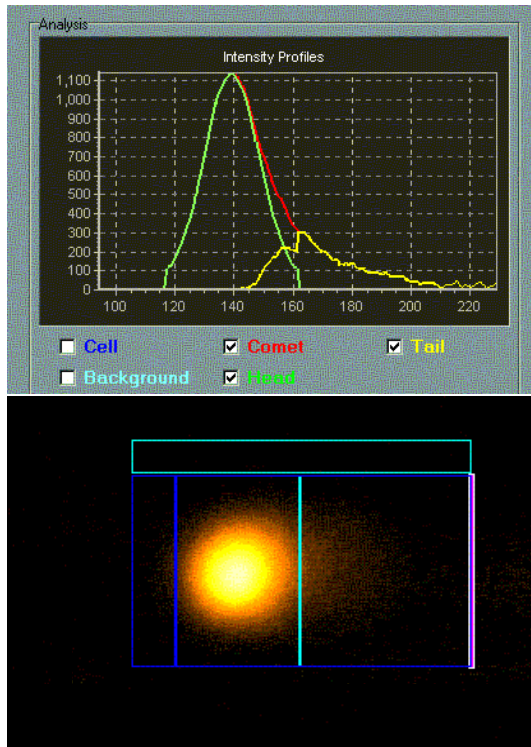


Abbildung 7. Geschädigte Zelle in der Auswertung mit Komet 3.1

2.4 Methodenspezifisches Material

2.4.1 Miniorgankulturen

Miniorgankulturen	Anleitung
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)	
500ml Bronchial Epithelial Basalmedium (BEBM) Supplement Pack: BPE-26, hEGF-5, Insulin-2.5, HC-250, Epinephrin-250, T3-3.35, Transferrin-5, RA-50	Suppl. Pack unter sterilen Verhältnissen zugeben, gut mischen und bei 4°C lagern
Agar 1,5%	
0,45g Agarpulver (Agar Noble) 30ml Aqua bidest.	Agarpulver und Aqua bidest. vermischen und in Mikrowelle erhitzen und sterilisieren
DMEM-Medium	
500ml Aqua bidest. 9,99g DMEM Pulver 1,96g HEPES Pulver	DMEM und HEPES in Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren und in 250ml Portionen abfüllen
DMEM-Agarplatten	
30ml Agar Noble 30ml DMEM 6ml FCS 75µl nicht essentielle Aminosäuren 240µl Amphotericin B 120µl Penicillin-Streptomycin-Lösung	DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin in sterilem Gefäß vermischen. Agar Noble erhitzen, mit supplementiertem Medium versetzen und 24-Well-Platte mit Multipipette mit 250µl beschichten
Enzymlösung zur Zellisolierung	
50mg Protease 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P	In 10ml BEGM lösen, sterilfiltrieren

Medikamente	Inhaltsstoffe:
Celebrex®	100mg Celecoxib, Lactose-Monohydrat, Natriumdodecylsulfat, Povidon K30, Croscarmellose-Natrium, Magnesium, E171, E132
Vioxx®	12,5mg Rofecoxib, Lactose-Monohydrat, mikrokristalline Cellulose, Hyprolose, Croscarmellose-Natrium, Magnesium (stearat, -palmitat, -oleat), E172

Enzyme, Zellkulturmedien, Chemikalien	Firma
Aminosäuren, nicht essentiell DMEM-Medium Fötale Kälber Serum Amphotericin B HEPES	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein Gibco Lifetechnologies, Eggenstein Gibco Lifetechnologies, Eggenstein Gibco Lifetechnologies, Eggenstein Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
(N-2-Hydroxaethylpiperazin- N`2-ethansulfonsäure)	
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) Supplement Pack für BEBM	Promocell, Heidelberg Promocell, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	Apotheke, LMU
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA

2.4.2 Mikrogelelektrophorese

Mikrogelelektrophorese	Anleitung
Agarose	
0,5% Low-Melting-Agarose 0,7% Normal-Melting- Agarose PBS	In PBS lösen, erhitzen und im Wasserbad bei 37°C aufbewahren
Lysestammlösung	
146,4 NaCl (2,5M) 1,2g Trishydroxymethylaminomethan (10mM) 37,2g Na ₂ EDTA (100mM) 10g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest.	NaCl, Trishydroxymethylaminomethan in 500ml Aqua bidest. lösen, Na ₂ EDTA in 160ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen, N-Lauroylsarcosinnatriumsalz in 160ml Aqua bidest. lösen, alles vermischen und mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen, pH-Wert auf 10 einstellen
Lysepuffer	
1ml Triton X-100 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in 100ml Messzylinder geben, mit Lysestammlösung auf 100ml auffüllen
Elektrophoresepuffer	
24g NaOH-Plätzchen (300mM) 0,744g Na ₂ EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na ₂ EDTA in 2l Aqua bidest. lösen, bei 4°C lagern
Neutralisationspuffer (400 mM)	
48,5g Trishydroxymethylaminomethan Aqua bidest.	Trishydroxymethylaminomethan in 1l Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen, Aufbewahrung bei Raumtemperatur
Ethidiumbromid-Färbelösung	
0,2mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung Aqua bidest.	1:10 Verdünnung mit Aqua bidest., sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren

Enzyme, Zellkulturmedien, Chemikalien	Firma
Bronchial Epithelial Basal Medium	Promocell, Heidelberg
Supplement Pack für BEBM	Promocell, Heidelberg
Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche, Mannheim
Kollagenase P aus Clostridium histolyticum	Roche, Mannheim
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Low Melting-Agarose, Sea-Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin Natrium Salz	Sigma, Steinheim
Normal Melting-Agarose, Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,4%	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Aqua bidest.	Apotheke, LMU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt

2.4.3 Geräte und Zubehör, Verbrauchsmaterial

Geräte und Zubehör	Firma
Analysenwaage Voyager (0,1mg-62mg) <u>Auswertung/Datenspeicherung:</u> Programm Komet 3.1 Datenspeicherung Elektrophoresenetzgerät E865 Gefrierschrank (-80) Horizontale Elektrophoresekammer (237x180mm) Kühlschrank (+ 4°C) und Gefrierschrank Magnetrührer Combimag RCT <u>Mikroskope:</u> Standardmikroskop Inversmikroskop DMIRB Fluoreszenzmikroskop DMLB Filtersystem N2.1, BP 516-560 Filtersystem I3, BP 450-490 Objektive 100x/1,25 Öl; 40x/0,5; 10x0,22; 4x/0,1 Mikrowelle MWS 2819 Minishaker MS1 pH-Meter 766 Calimatic Schüttelwasserbad 1083 Spiegelreflexkamera Sterilbank Herasafe Waage 1419 (1mg-600g) Zellzählkammer nach Neubauer Zentrifuge Varifuge 3.ORS und 3.OR	Ohaus, Gießen Kinetic Imaging, Liverpool Microsoft Excel Renner, Dannstadt New Brunswick Scientific, Nürtingen Renner, Dannstadt Bosch, Stuttgart IKA, Staufen Zeiss, Oberkochen Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Bauknecht, Schorndorf IKA-WORKS, Wilmington, USA Knick, Berlin GFL, Burgwedel Minolta, Osaka, Japan Heraeus, Hanau Sartorius, Gießen Merck, Darmstadt Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien	Firma
<p>24-Well-Platte Combitips Objektträger 24x70 mm, je 5mm seitlich mattiert Objektträgerkasten Deckgläser für Objektträger (76x26 mm) Einmalspritzen (5ml, 10ml) Einwegfiltereinheiten steril, Millex-GV, Millex-GS Farbfilme ISO 100 Pipette aus Polystyrol (2, 5, 10, 25ml), steril Pipettenspitzen (200, 1000µl), steril Reaktionsgefäß 1,5ml Röhrchen mit Schraubverschluss (13ml) Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml) Stericup (150ml), steril Skalpell Petrischalen Pinzetten Schreibdiamant</p>	<p>Falcon, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Langenbrinck, Emmendingen GLW, Würzburg Langenbrinck, Emmendingen Becton Dickinson, Heidelberg Millipore, Eschborn Agfa, Leverkusen Greiner, Frickenhausen Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Greiner, Frickenhausen Millipore, Eschborn Pfm., Köln VWR, Deutschland Angiokard, Deutschland Renner, Dannstadt</p>

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Analyse

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse mit dem Datenanalyseprogramm SPSS™ 13.1 wurden Boxplots verwendet. Als Box bezeichnet man das Rechteck, welches aus dem oberen und unteren Quartil gebildet wird. Die Länge des Boxplots zeigt den Interquartilsabstand, welcher ein Streuungsmaß darstellt und durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt wird. Die horizontale Linie in der Mitte des Boxplots stellt den Median dar. Die obere Begrenzungslinie des Boxplots ist definiert als die 75. Perzentile und die untere als die 25. Perzentile. Die Boxplots beinhalten zwei weitere Linien, den sog. oberen und den unteren *Whisker*, Ausreißer, die mehr als eineinhalb Boxplotlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis, die mehr als drei Boxplotlängen außerhalb liegen, mit einem Stern, markiert.

Für die statistische Analyse wurden gemittelte OTM Werte, nach Auswertung von insgesamt 80 Zellen pro Testansatz bzw. Kontrolle, verwendet. Um die antioxidative Wirkung der Testsubstanzen bzw. Testansätze zu bestimmen, wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Daten durchgeführt.

Das allgemeine Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3.2 Vitalitätstest

Um eine eventuelle Zytotoxizität der Substanzen zu bestimmen, wurde nach Zellseparation für jeden Testansatz ein Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Die ermittelten Vitalitäten lagen stets zwischen 85 und 100%.

3.3 Induktion einer DNA-Schädigung durch Hydrogenperoxid (H₂O₂)

H₂O₂ induziert genotoxische Schäden im Sinne von DNA-Strangbrüchen. Diese Fragmente zeigen im elektrischen Feld der Elektrophorese ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Kleinere Fragmente, Ausdruck starker Schädigung wandern dabei schneller Richtung Anode als größere Fragmente. Es zeigt sich das Bild eines sog.

Kometen, mit intakter DNA im „Kopf“ und fragmentierter DNA im „Schweif“. (siehe Abb. 8 und 9)

Das Maß der Schädigung, der *Olive Tail Moment* (OTM) wird bei der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop und digitaler Bildverarbeitung ermittelt, wobei man erst bei einem OTM von mehr als 2,0 von einer relevanten DNA Schädigung ausgeht (Olive und Banath, 1993).

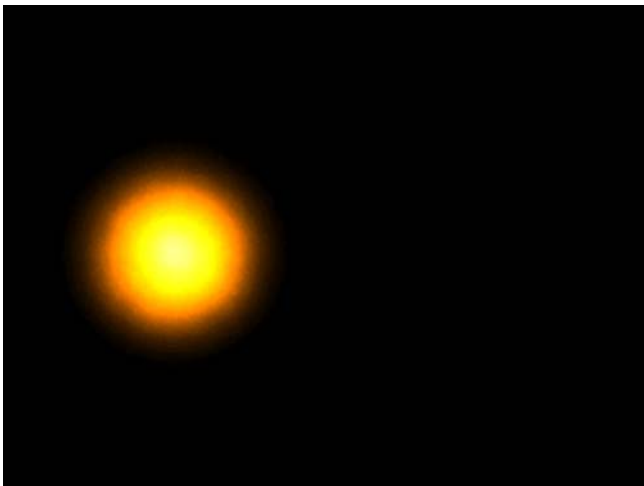


Abbildung 8. Unfragmentierte DNA einer mit Ethidiumbromid gefärbten Schleimhautzelle.

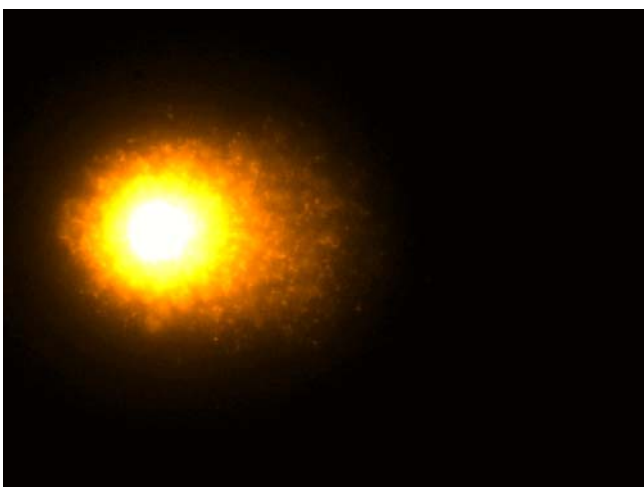


Abbildung 9. Mittelgradige fragmentierte DNA einer mit Ethidiumbromid gefärbten Schleimhautzelle.

3.4 Analyse der antioxidativen Effekte von Celebrex[®] und Vioxx[®] an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

3.4.1 Genotoxizitätsmessung von Celebrex[®] in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

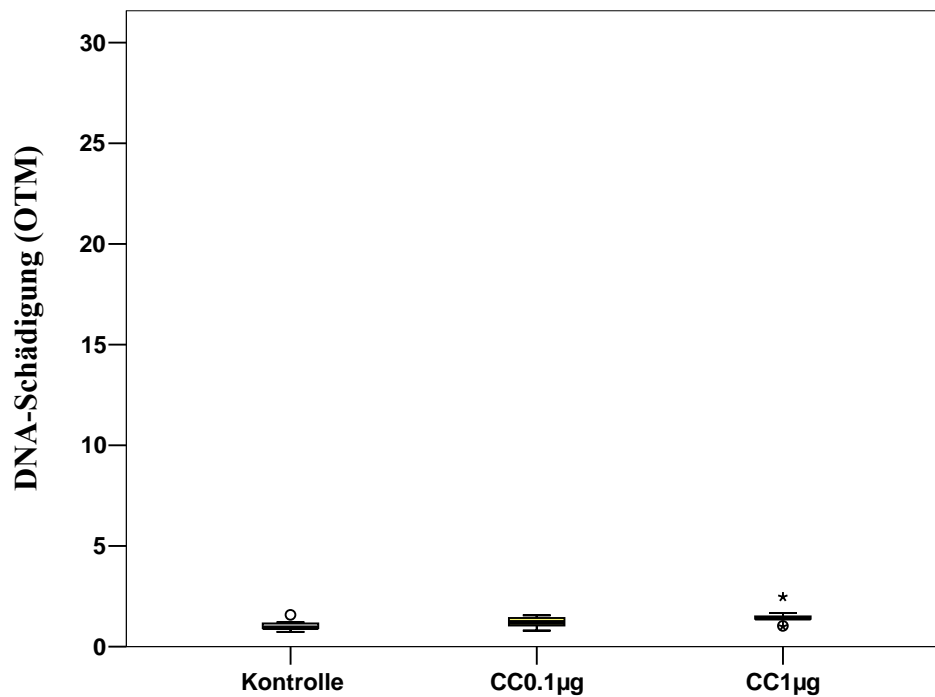


Abbildung 10. Analyse der Genotoxizität von DMSO (Kontrolle) und von Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg/ml und 1µg/ml; n=10.

Kontrolle: DMSO

CC 0,1µg: Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), in der Konzentration 0,1µg/ml

CC 1µg: Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), in der Konzentration 1µg/ml

Die Analyse der Kontrolle (DMSO), die zugleich auch als Lösungsmittel für die Medikamente diente, zeigt mit einem OTM-Mittelwert von $1,08 \pm 0,28$ keine Induktion von DNA-Schäden. Im Vergleich dazu zeigt Celebrex[®] in der Konzentration $0,1\mu\text{g/ml}$ (OTM-Mittelwert von $1,28 \pm 0,35$) und in der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$ (OTM-Mittelwert von $1,48 \pm 0,43$) zwar eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (Abb.10, Tab.1), da aber die OTM-Werte bei $< 2,0$ liegen, ist nicht von einer genotoxischen Schädigung auszugehen (Olive und Banath, 1993).

Tabelle 1. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen der Celebrex[®] Konzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ und $1\mu\text{g/ml}$ und der Kontrolle (DMSO).

	CC0.1 μg - Kontrolle	CC1 μg - Kontrolle
Asymptotische Signifikanz	0,017	0,015

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.2 Genotoxizitätsmessung von Hydrogenperoxid (H₂O₂) an nasaler Schleimhaut

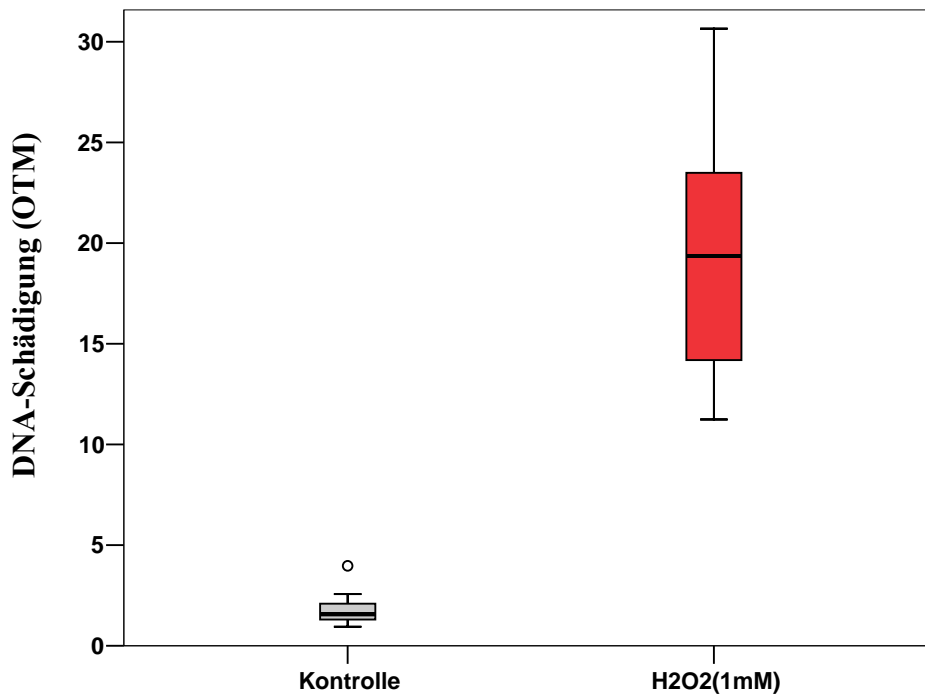


Abbildung 11. Darstellung der Genotoxizität von Hydrogenperoxid (H₂O₂) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO); n=20.

H₂O₂ zeigt eine signifikant genotoxische Wirkung (OTM-Mittelwert $19,42 \pm 5,70$) im Vergleich zur Kontrolle (OTM-Mittelwert $1,75 \pm 0,70$) (Abb.11, Tab.2)

Tabelle 2. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen DMSO und H₂O₂.

	H ₂ O ₂ - Kontrolle
Asymptotische Signifikanz	0,001

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.3 Antioxidativer Effekt von Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg/ml und 1µg/ml an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

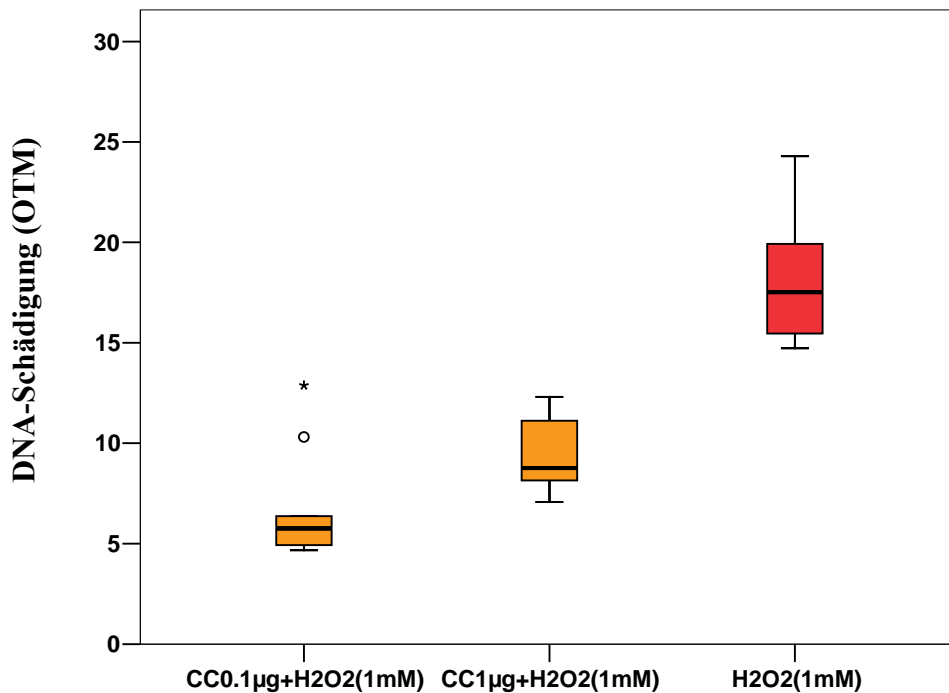


Abbildung 12.1. Analyse der DNA-Schädigung bei mit Celebrex[®], in der Konzentration 0,1µg/ml und 1µg/ml behandelten Miniorgankulturen, im Vergleich zu unbehandelten Miniorgankulturen; n=10.

2. Vergleich zwischen den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml nach oxidativer Schädigung; n=10.

H₂O₂ (1mM): Schädigung un behandelter Zellen mit H₂O₂
 CC0,1µg+H₂O₂(1mM): Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), Konzentration 0,1µg/ml und Schädigung mit H₂O₂ (1mM)
 CC1µg+H₂O₂(1mM): Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), Konzentration 1µg/ml und Schädigung mit H₂O₂ (1mM)

Zu 1.: Die Konzentration von 0,1µg/ml (OTM-Mittelwert $6,70 \pm 2,71$) als auch die Konzentration von 1µg/ml (OTM-Mittelwert $9,49 \pm 1,99$) zeigt eine signifikant verminderte genotoxische Schädigung im Vergleich zu den allein mit H₂O₂ versetzten Miniorgankulturen (OTM-Mittelwert $17,23 \pm 4,10$) (Abb.12, Tab.3).

Tabelle 3. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml und der alleinigen Behandlung mit H₂O₂.

	H ₂ O ₂ - CC0.1µg+H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ - CC1µg+H ₂ O ₂
Asymptotische Signifikanz	0,005	0,008

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

Zu 2.: Beim Vergleich der Celebrex[®] Konzentration von 0,1µg/ml (OTM-Mittelwert $6,70 \pm 2,71$) mit der Celebrex[®] Konzentration von 1µg/ml (OTM-Mittelwert $9,49 \pm 1,99$) zeigt sich bei der Konzentration von 0,1µg/ml ein signifikant stärkerer antioxidativer Effekt als bei der Konzentration von 1µg/ml (Abb.12, Tab.4).

Tabelle 4. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml.

	CC1µg+H ₂ O ₂ - CC0.1µg+H ₂ O ₂
Asymptotische Signifikanz	0,011

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.4 Genotoxizitätsmessung von Vioxx® (0,0125µg/ml) nach Einmal- und Mehrfachgabe an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

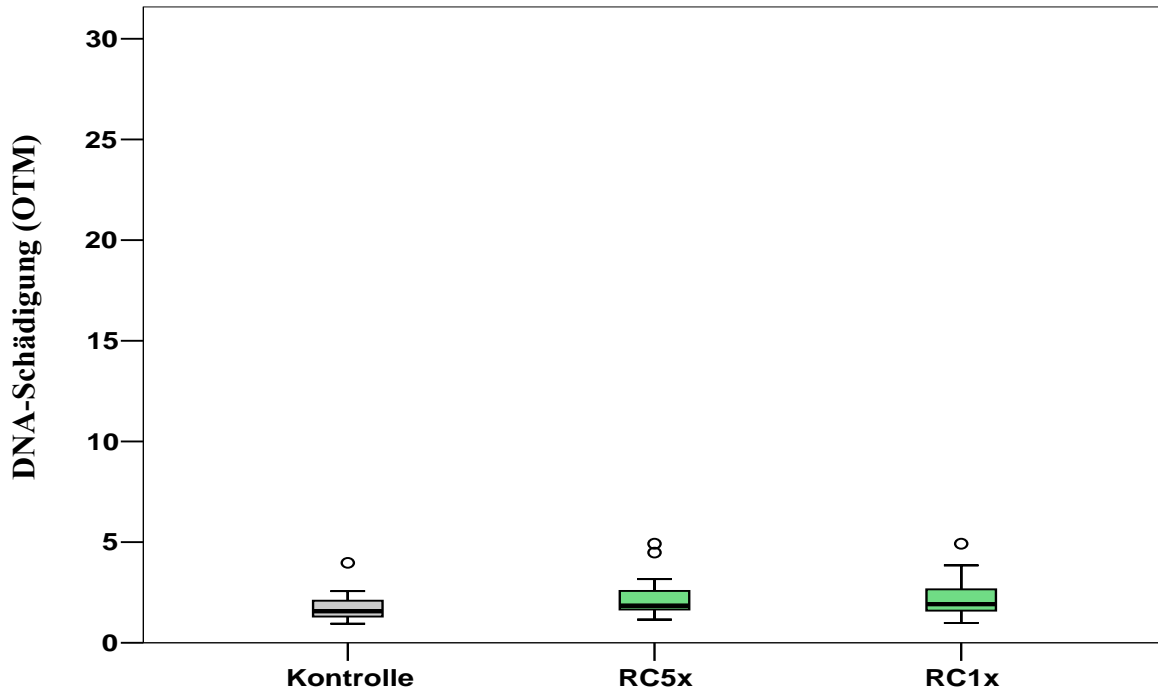


Abbildung 13. Analyse der Genotoxizität von DMSO (Kontrolle) und von Vioxx® nach fünfmaliger und nach einmaliger Gabe; n=20.

Kontrolle: DMSO

RC 5x: Vioxx® (Wirkstoff Rofecoxib), fünfmalige Gabe

RC 1x: Vioxx® (Wirkstoff Rofecoxib), einmalige Gabe

Die Analyse der Kontrolle (DMSO), die zugleich auch als Lösungsmittel für die Medikamente diente, zeigt mit einem OTM-Mittelwert von $1,75 \pm 0,70$ keine Induktion von DNA-Schäden. Zwar zeigt die fünfmalige (OTM-Mittelwert $2,20 \pm 1,02$) und die einmalige (OTM-Mittelwert $2,16 \pm 0,96$) Gabe von Vioxx® eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle, jedoch geht man, wie unter 3.3 beschrieben, erst ab einem OTM > 2,0 von einer aussagekräftigen DNA Schädigung aus (Abb.13, Tab.5).

Tabelle 5. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen der fünfmaligen Gabe von Vioxx[®] mit der Kontrolle und der einmaligen Gabe von Vioxx[®] mit der Kontrolle.

	RC 5x - Kontrolle	RC 1x - Kontrolle
Asymptotische Signifikanz	0,008	0,011

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.5 Genotoxizitätsmessung von Celebrex[®] (0,1µg/ml) nach Einmal- und Mehrfachgabe an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

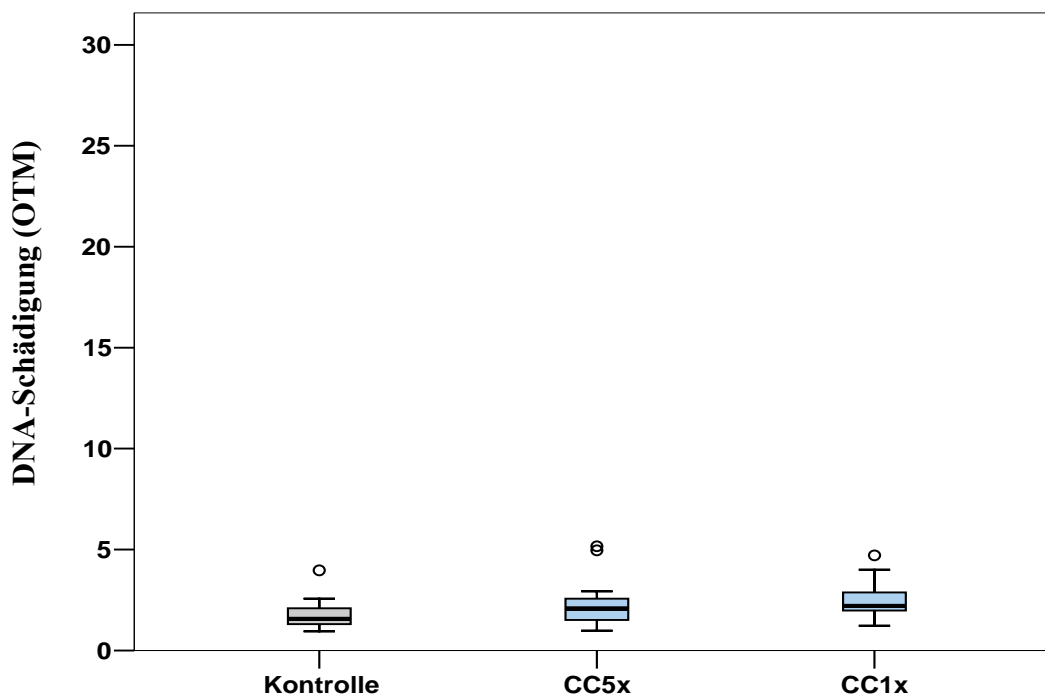


Abbildung 14. Analyse der Genotoxizität von DMSO (Kontrolle) und von Celebrex[®] nach fünfmaliger und nach einmaliger Gabe; n=20.

Kontrolle: DMSO

CC 5x: Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), fünfmalige Gabe

CC 1x: Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), einmalige Gabe

Die fünfmalige Gabe von Celebrex[®] wirkt sich mit einem OTM-Mittelwert von $2,28 \pm 1,10$ und die einmalige Gabe von Celebrex[®] mit einem OTM-Mittelwert von $2,43 \pm 0,92$ nicht genotoxisch auf die DNA aus. Im Vergleich die Kontrolle (OTM-Mittelwert $1,75 \pm 0,70$). Auch hier zeigte sich eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle, wobei die OTM Werte wiederum zu gering für eine DNA Schädigung sind (Abb.14, Tab.6)

Tabelle 6. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen der fünfmaligen Gabe von Celebrex[®] mit der Kontrolle und der einmaligen Gabe von Celebrex[®] mit der Kontrolle.

	CC 5x - Kontrolle	CC1 x - Kontrolle
Asymptotische Signifikanz	0,044	0,002

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.6 Antioxidativer Effekt von Vioxx[®] an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

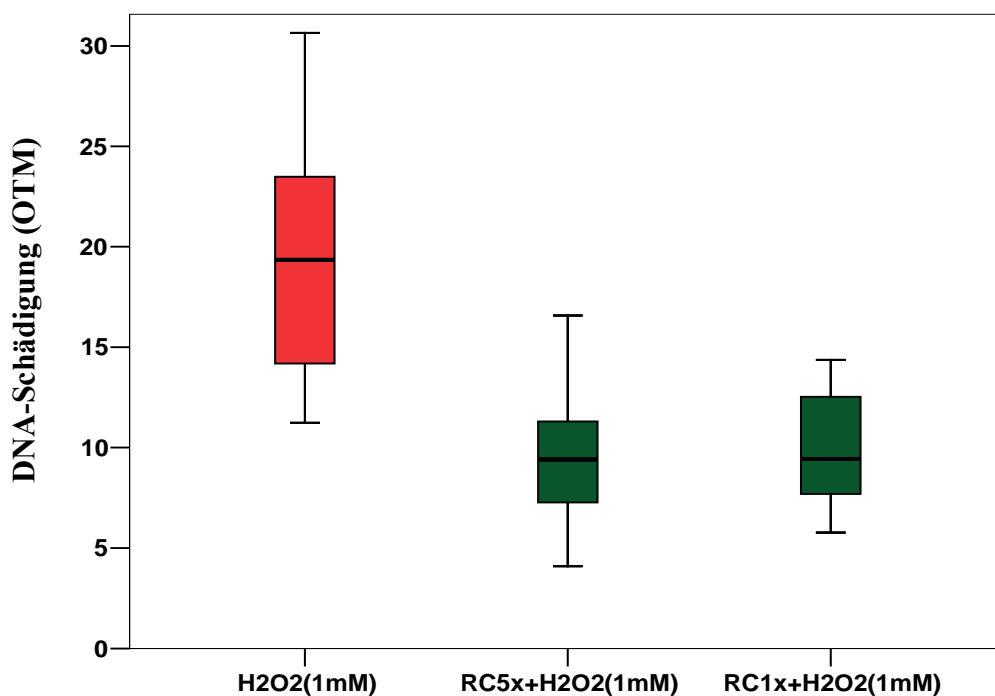


Abbildung 15. 1. Analyse der DNA-Schädigung bei, mit Vioxx[®] fünfmalig und einmalig behandelten Miniorgankulturen, im Vergleich zu unbehandelten Miniorgankulturen; n=20.

2. Vergleich zwischen der fünfmaligen und einmaligen Inkubation mit Vioxx[®] nach oxidativer Schädigung; n=20

H₂O₂: Schädigung unbehandelter Zellen mit H₂O₂
 RC 5x + H₂O₂(1mM): Vioxx[®] (Wirkstoff Rofecoxib), fünfmalige Gabe, dann Schädigung mit H₂O₂
 RC1 x + H₂O₂(1mM): Vioxx[®] (Wirkstoff Rofecoxib), einmalige Gabe, dann Schädigung mit H₂O₂

Zu 1.: In den fünfmalig (OTM-Mittelwert $9,76 \pm 3,44$) und einmalig (OTM-Mittelwert $10,08 \pm 2,61$) mit Vioxx[®] vorbehandelten Miniorgankulturen zeigt sich nach Induktion eines oxidativen Schadens durch H₂O₂ eine signifikant geringere Schädigung als bei

unbehandelten Miniorgankulturen, welche nur mit H_2O_2 inkubiert wurden (OTM-Mittelwert $19,42 \pm 5,70$) (Abb.15, Tab.7).

Tabelle 7. p-Werte im Wilcoxon-Test für die fünfmalige und einmalige Gabe von Vioxx[®] mit H_2O_2 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit H_2O_2 .

	RC 5x+ H_2O_2 - H_2O_2	RC 1x+ H_2O_2 - H_2O_2
Asymptotische Signifikanz	0,001	0,001

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

Zu 2.: Die Analyse eines kumulativen Effekts ergab für den Vergleich zwischen der einmaligen, mit einem OTM-Mittelwert von $10,08 \pm 2,61$ und der fünfmaligen Vioxx[®] Inkubation, mit einem OTM-Mittelwert von $9,76 \pm 3,44$ keinen signifikanten Unterschied (Abb.15, Tab.8)

Tabelle 8. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen der fünfmaligen und einmaligen Inkubation mit Vioxx[®] und Schädigung.

	RC 1x+ H_2O_2 - RC5x+ H_2O_2
Asymptotische Signifikanz	0,823

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

3.4.7 Antioxidativer Effekt von Celebrex[®] an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut

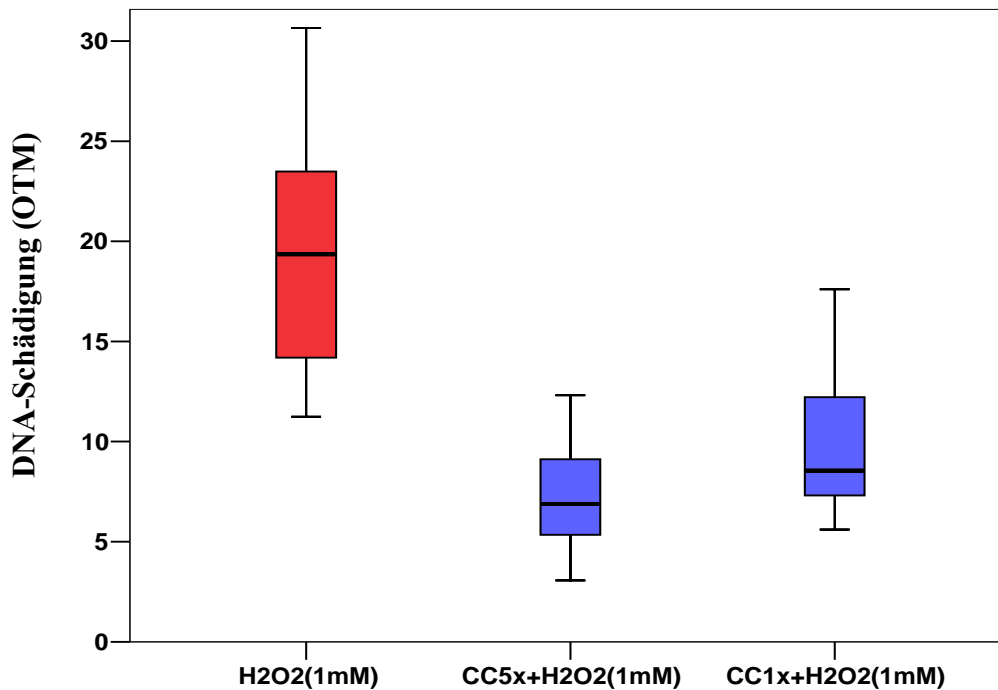


Abbildung 16. 1. Analyse der DNA-Schädigung bei, mit Celebrex[®] fünfmalig und einmalig behandelten Miniorgankulturen, im Vergleich zu unbehandelten Miniorgankulturen; n=20.

2. Vergleich zwischen der fünfmaligen und einmaligen Inkubation mit Celebrex[®] nach oxidativer Schädigung, n=20.

H₂O₂: Schädigung un behandelter Zellen mit H₂O₂

CC 5x + H₂O₂(1mM): Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), fünfmalige Gabe, dann Schädigung mit H₂O₂

CC 1x + H₂O₂ 1mM): Celebrex[®] (Wirkstoff Celecoxib), einmalige Gabe, dann Schädigung mit H₂O₂

Zu 1.: Die fünfmalige (OTM-Mittelwert $7,29 \pm 2,60$) und die einmalige (OTM-Mittelwert $9,80 \pm 3,20$) Inkubation mit Celebrex[®] zeigt nach oxidativer Schädigung mit H₂O₂ eine signifikant verminderte DNA-Fragmentierung im Vergleich zur alleinigen Schädigung mit H₂O₂ (OTM-Mittelwert $19,42 \pm 5,70$) (Abb.16, Tab.9).

Tabelle 9. p-Werte im Wilcoxon-Test für die fünfmalige und einmalige Gabe von Celebrex[®] mit H₂O₂ im Vergleich zur Schädigung ohne Vorbehandlung.

	CC 5x+H ₂ O ₂ - H ₂ O ₂	CC 1x+H ₂ O ₂ - H ₂ O ₂
Asymptotische Signifikanz	0,001	0,001

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

Zu 2.: Die fünfmalige Gabe von Celebrex[®] (OTM-Mittelwert $7,29 \pm 2,60$) verstärkt den antioxidativen Effekt von Celebrex[®] im Vergleich zur einmaligen Gabe (OTM-Mittelwert $9,80 \pm 3,20$) signifikant (Abb.16, Tab.10).

Tabelle 10. p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich zwischen der fünfmaligen und einmaligen Inkubation mit Celebrex[®] und Schädigung.

	CC 1x+H ₂ O ₂ – CC 5x+H ₂ O ₂
Asymptotische Signifikanz	0,001

Das lokale Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Patienten

Als Spender der Nasenschleimhaut wurden Patienten ausgewählt, die sich in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgrund einer Nasenatmungsbehinderung einer Verkleinerung der unteren Nasenmuschel (Conchotomie) unterzogen haben. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Patienten an keinen chronischen oder systemischen Krankheiten leiden.

Die konstant hohe Inidenz von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und die Tatsache, dass die Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes gerade die nasale Schleimhaut ein erstes Kontaktorgan für Karzinogene im oberen Aerodigestivtrakt darstellen, erfordern die Testung tumorprotektiver Substanzen an Schleimhautzellen im Kopf-Hals-Bereich.

4.2 Ausschluss genotoxischer Effekte der COX-2-Inhibitoren

Celebrex[®] und Vioxx[®]

In der vorliegenden Arbeit konnte, nach Inkubation der nasalen Schleimhaut sowohl mit Celebrex[®] in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1µg/ml, als auch mit Vioxx[®] in der Konzentration 0,0125µg/ml keine genotoxische Wirkung auf die DNA festgestellt werden.

Zu einem fraglichen genotoxischen Potential der COX-2-Inhibitoren, gibt es nach Vergleich mit der aktuellen Literatur, keine Daten. Jedoch finden sich einige Studien, die sich mit dem toxischen bzw. zytotoxischen Potential der COX-2-Inhibitoren befassen. Dieses Potential entsteht entweder durch die Präparate selbst oder durch die Konsequenzen, welche die Inhibition der Cyclooxygenase mit sich bringt.

Wichtig in diesem Zusammenhang sind die negativen Effekte der COX-2-Inhibitoren auf das kardiovaskuläre System. Durch den Vorgang der COX-2-Inhibition, wird u.a. die Bildung des Prostaglandin I₂ vermindert (FitzGerald, 2003). Prostaglandin I₂ ist das vorherrschende COX-2 Produkt in Endothelzellen, es verhindert die Plättchen-

aggregation, ist beteiligt an der Gefäßdilataion und verhindert in vitro das Wachstum glatter Muskelzellen in Gefäßen. Ein weiterer Mechanismus in der COX-2-Inhibition erhöht ebenfalls das kardiovaskuläre Risiko. Prostaglandin I₂ hält sich mit seinem Gegenspieler Thromboxan A₂, hauptsächlich ein COX-1 Produkt, zuständig für die Plättchenaggregation, die Vasokonstriktion und für die Gefäßproliferation, die Balance. Wird nun die COX-2 inhibiert, so wird das vorherrschende Gleichgewicht zu Gunsten der COX-1, also dem Thromboxan A₂ verschoben. Das Resultat ist eine höhere Neigung zu thrombembolischen Ereignissen (FitzGerald, 2004) und durch die stärkere Vasokonstriktion eine Erhöhung des Blutdrucks (Bresalier et al., 2005).

Im Gastrointestinaltrakt fungieren die Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ als wichtige zytoprotektive Substanzen. Obwohl durch den Einsatz von COX-2-Inhibitoren die toxischen Effekte auf den Gastrointestinaltrakt, im Vergleich zu nicht-selektiven NSAR, verringert werden konnten (Silverstein et al., 2000; Bombardier et al., 2000), diskutiert Tomisato et al. einen potentiellen, direkten cytotoxischen Effekt von COX-2-Inhibitoren auf Magenschleimhautzellen, wobei der genaue Mechanismus dieser Toxizität noch unbekannt ist (Tomisato et al., 2004).

Diskutiert werden u.a. auch toxische Effekte der COX-2-Inhibitoren auf die Niere, vor allem bei Patienten mit bestehender Einschränkung der Nierenfunktion (Gooch et al., 2007) und toxischer Effekte der COX-2-Inhibitoren auf die Leberfunktion, die jedoch keine folgenschweren Ausmaße einnehmen (Yan et al., 2006).

4.3 Genotoxizität von Hydrogenperoxid (H₂O₂)

Zahlreiche Radikale, welche genotoxische Schäden verursachen, werden täglich im menschlichen Körper produziert. Zur in vitro Simulation dieses oxidativen Stresses wurde in der vorliegenden Arbeit Hydrogenperoxid (H₂O₂) verwendet, welches ein wichtiges Radikal in diesem Zusammenhang darstellt.

Es zeigte sich, wie erwartet eine signifikant genotoxische Wirkung des H₂O₂ im Vergleich zur Kontrolle.

Die Genotoxizität von H_2O_2 entsteht durch die Reaktion mit DNA-gebundenen Metallionen, wobei Hydroxylradikale produziert werden (Halliwell et al., 2000). Diese Hydroxylradikale führen u.a. zur Oxidation von DNA-Basen und zwar hauptsächlich von Guanin und Adenin, wobei die Oxidation von Adenin weniger ursächlich für DNA-Läsionen sind (Jaruga et al., 2001). Die Interaktion zwischen Hydroxylradikalen und Guanin erzeugt 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8-Oxo-dG) und 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidin (FAPy-G) (Mao et al., 1998; Boiteux und Radicella, 2000). Formamidopyrimidine sind bekannt dafür, dass sie die DNA-Replikation blockieren (Basu et al., 1989), 8-Oxo-dG bewirkt eine Transversion der Basen Guanin und Cytosin zu Thymin und Adenin (Shibutani et al., 1991). Diese chemischen Veränderungen der Basen können dann zur Entstehung von Karzinomen beitragen.

Zahlreiche Studien verwendeten H_2O_2 zur Induktion genotoxischer Schäden. Sliwinski et al. induzierten mit H_2O_2 genotoxische Schäden in ihren Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von Melatonin (Sliwinski et al., 2007). Ebenso verwendeten Poplawski et al. H_2O_2 in ihrer Studie zur Genese des Magenkarzinoms (Poplawski et al., 2006).

Die bisherigen Untersuchungen über die Eigenschaften von Wasserstoffperoxid stützen die Entscheidung Wasserstoffperoxid für diese Arbeit zu verwenden. Und auch die Tatsache, dass die menschliche DNA täglich enormen Belastungen durch oxidativen Stress ausgesetzt ist und die Karzinogenese damit in Gang gesetzt werden kann.

4.4 Festlegung der auf die Kopf-Hals-Karzinogenese Einflussnehmenden Konzentration des Präparates Celebrex[®]

In der vorliegenden Untersuchung wurde der antioxidative Effekt von Celebrex[®] in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Ein Teil der Miniorgankulturen wurde mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Wirkstoff Celecoxib 0,024 μmol) Celebrex[®] vorinkubiert, ein anderer Teil mit 1 $\mu\text{g/ml}$ (Wirkstoff Celecoxib 0,24 μmol) und im Anschluss durch H_2O_2 geschädigt. Beide Konzentrationen zeigten im Vergleich zur Ausgangsschädigung eine signifikant verminderte genotoxische Schädigung.

Verglichen mit der Literatur findet man zahlreiche Studien, die sich mit dosisabhängigen Wirkungen von Celebrex[®] bei verschiedenen Krebserkrankungen

befassen, wobei generell viel höhere Konzentrationen verwendet werden als in dieser Arbeit. Chen et al. verwendeten Celecoxib in den Konzentrationen von 7,2-200 μ mol an verschiedenen Zelllinien des nasopharyngealen Karzinoms.

Diese Studie zeigte, dass sich mit steigender Dosis auch eine deutliche Suppression des Plattenepithelkarzinomwachstums, beruhend auf Blockade des Zellzyklus und Induktion des programmierten Zelltodes erreichen ließ (Chen und Long, 2004). Chan et al., die ebenso Zelllinien des nasopharyngealen Karzinoms mit 0, 50 und 80 μ M Celecoxib behandelten, konnten eine Abnahme der Cyclin D1 Expression erst ab einer Konzentration von 50 μ M feststellen (Chan et al., 2005).

In einem in vivo Mausmodell, erhielten Mäuse mit Adenokarzinom der Prostata, Celecoxib in Dosen von 200mg/kg, 400mg/kg, 600mg/kg und 1000mg/kg.

Dosen >400mg/kg zeigten signifikant eine Unterdrückung des intraepithelialen Tumorstwachstums der Maus-Prostata (mPIN) und des Adenokarzinoms der Prostata. Die Inhibition des Tumor-Wachstums war mit einer steigenden Rate der Apoptose assoziiert (Narayanan et al., 2006).

Auch eine in vivo Studie von Iwama et al., die sich mit COX-2-Hemmern im Zusammenhang mit der familiären adenomatösen Polyposis coli beschäftigten, zeigte, dass eine orale Gabe von 150mg und 200mg im Verlauf von 26 Wochen keine suffiziente Reduktion der Polypen im Vergleich zur Kontrollgruppe erreichte. Es wurden auch hier wesentlich höhere Dosen benötigt (Iwama et al., 2006).

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit befassen sich die aktuellen Studien nicht mit einer potentiell antioxidativen/protektiven Wirkung der COX-2-Hemmer und ermitteln stets erst mit höheren Konzentrationen signifikante Ergebnisse. In der vorliegenden Studie, die sich mit der antioxidativen Wirkung befasst, konnte gezeigt werden, dass schon eine geringe Dosis eine antioxidative Wirkung in humanen Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes erzielen kann.

Auffallend war darüber hinaus, nach Vergleich der Konzentrationen untereinander, dass die geringere Dosis (0,1 μ g) einen stärkeren antioxidativen Effekt zeigte, als die höhere Dosis (1 μ g). Möglicherweise wird durch eine Dosisreduktion eine geringere Genotoxizität von Celecoxib und somit auch ein verringertes Karzinomrisiko erzielt. Andererseits könnte eine erhöhte Konzentration evtl. auch zu einer gewissen Übersättigung der Zellsysteme mit möglichen negativen Auswirkungen führen. Jedoch gerade in Anbetracht der unter 4.2 beschriebenen zahlreichen unerwünschten

Wirkungen der COX-2-Inhibitoren, ist gerade eine Dosisreduktion besonders von Vorteil.

Dieses Ergebnis unterstützt in gewisser Weise die in vivo Studie von Sievers et al. mit einem Mausmodell, in dem Mäuse mit Adenokarzinomen der Lunge mit Celecoxib in der Konzentration von 5-25µmol behandelt wurden. Es zeigte sich keine signifikante Inhibition der Tumorproliferation mit steigender Dosis (Sievers et al., 2005).

Auch Abou-Issa et al. zeigten bei Mäusen mit Mammakarzinom, welche 250, 500, 1000 und 1500mg Celecoxib/kg Körpergewicht erhielten, eine dosisabhängige Effektivität im Sinne einer Reduktion des Tumor-Volumens und dass bereits bei geringen Dosen (Abou-Issa et al., 2001).

Da Celebrex[®] in der Konzentration 0,1µg eine ausgeprägtere antioxidative Wirkung zeigte als in höheren Konzentrationen, wurde diese Konzentration für die weiteren Versuchsreihen ausgewählt.

4.5 Die antioxidativen Effekte der COX-2-Inhibitoren Celebrex[®] und Vioxx[®]

In vielen maligne transformierten Geweben, das Kopf-Hals-Karzinom eingeschlossen, kann eine erhöhte Prostaglandin Produktion beobachtet werden (Bennett et al., 1980; Rigas et al., 1993). Diese erhöhte Prostaglandinproduktion scheint im Zusammenhang mit einer erhöhten COX-2-Expression zu stehen, die durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert wird, hierzu zählen Wachstumsfaktoren, Onkogene und Tumor-Suppressorgene. Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der hauptsächlich in malignem Gewebe des Verdauungstraktes aber auch im Kopf-Hals-Bereich erhöht ist, kann eine gesteigerte COX-2-Expression bewirken (Mestre et al., 1997; Moraitis et al., 2005). Auch die mutierte Form des Tumorsuppressorgens p53 kann, in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, des Ösophagus und des Magens eine gesteigerte COX-2-Expression hervorrufen. Dies unterstützen Studien bezüglich erhöhter COX-2-Expression im Rahmen einer p53 Mutation (Subbaramaiah et al., 1999; Leung et al., 2001). Auch exogen zugeführte Karzinogene, wie z.B. die karzinogenen Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs, können das COX-2-Gen aktivieren und somit die COX-2-Expression steigern (Kelley et al., 1997).

Der Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und der Karzinogenese wurde erstmalig in zahlreichen Studien zur Genese des Kolonkarzinoms untersucht, bei denen die Effizienz von Aspirin[®] und anderen NSAR getestet wurde. Auch in Neoplasien des Kolonkarzinoms wurde eine gesteigerte COX-2-Expression gefunden (Sheehan et al., 2004). Das Ergebnis präsentierte eine Reduktion des relativen Risikos an einem Kolonkarzinom zu erkranken ebenso, wie eine Tumorregression bei bestehendem Karzinom (Gupta und DuBois, 2001). Wichtig in diesem Zusammenhang waren auch Tierversuche, bei welchen „knock out“-Mäuse, also Mäuse ohne COX-2-Gen, ein signifikant reduziertes Auftreten von intestinalen Polypen gezeigt wurde (Oshima et al., 1996). Doch eben nicht nur das kolorektale Karzinom, sondern auch zahlreiche andere Tumorarten, wie Tumore der weiblichen Brust, der Lunge, der Prostata, des Pankreas, der Blase, des Magens, des Ösophagus und schließlich auch Tumore des Kopf-Hals-Bereiches zeigen eine gesteigerte COX-2-Expression (Dixon, 2003; Sakurai et al., 2007).

Zu den genauen Mechanismen, wie eine gesteigerte COX-2-Expression die Karzinogenese in Gang setzt, gibt es diverse Untersuchungen.

COX-2 ist ein bifunktionales Enzym, mit einer Peroxidase-aktiven und einer Cyclooxygenase-aktiven Seite (Altorki et al., 2003). Die Peroxidase-aktive Seite ist in der Lage Prokarzinogene in Karzinogene umzuwandeln (Eling et al., 1990; Marnett et al., 1978). Auch die Apoptose, der programmierte Zelltod, steht in Zusammenhang mit der COX-2, denn eine forcierte Überexpression der COX-2 in Epithelzellen, zeigte eine Inhibition der Apoptose (Tsujii und DuBois, 1995).

Auch wird die Angiogenese, die die Grundlage für das Wachstum eines Tumors darstellt, durch COX-2 gesteigert, denn die Expression des *vascular epithelial growth factor* (VEGF) und somit die Vaskularisation des Tumors korreliert mit der Menge an COX-2 (Gallo et al., 2001). Abschließend gilt natürlich ein chronischer Entzündungsreiz, welcher eine gesteigerte Prostaglandin-Produktion beinhaltet, u.a. auch als Risikofaktor für die Genese von Karzinomen (Weitzman und Gordon, 1990).

Die Untersuchungen über den Zusammenhang von COX-2 und der humanen Karzinogenese stützen die Entscheidung, die COX-2-Inhibitoren bezüglich seiner antioxidativen Wirkung zu analysieren.

Inwiefern ein Zusammenhang zwischen oxidativen Schäden und der COX-2-Expression besteht bzw. ob sich mit dem Einsatz von COX-2-Inhibitoren die Möglichkeit eröffnet

durch antioxidative Wirkmechanismen die Karzinomentstehung zu beeinflussen, ist in der Literatur für das Kopf-Hals-Karzinom nicht thematisiert.

Ajith et al. untersuchten die antioxidativen Effekte von Celecoxib in einem in vitro Modell an Rattenlebern und an Bakterienstämmen (*Salmonella typhimurium*) (Ajith et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass Celecoxib in der Lage war die Oxidation von Lipiden zu inhibieren. Der genaue Mechanismus blieb jedoch noch unklar. Es wird vermutet, dass Celecoxib entweder direkt das Peroxyl-Radikal abfängt oder dass Celecoxib das Radikal durch die Bereitstellung von Reduktions-Equivalenten neutralisiert. Ebenso zeigte die Studie, dass Celecoxib konzentrationsabhängig bereits schon ab 0,05µmol Hydroxylradikale abfängt.

Im Gegensatz dazu steht die in vivo Studie von Ozgocmen et al., die den antioxidativen Effekt von Celecoxib nach vierwöchiger Gabe, an Patienten mit Osteoarthritis untersuchten. In den Mittelpunkt ihrer Untersuchungen wurden die von oxidativen Stress abhängigen Enzyme, wie die Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GSH-Px), Xanthinoxidase (XO), Malondialdehyd, ein Marker der Lipid-Oxidation und das Stickoxid gestellt, welche im Serum gemessen wurden. Das Ergebnis war, dass mit Celecoxib keine signifikante Verminderung der SOD, der GSH-Px und der XO ermittelt werden konnte (Ozgocmen et al., 2005).

Mit dieser Arbeit konnte eine signifikant antioxidative Wirkung sowohl von Vioxx[®] als auch von Celebrex[®] gezeigt werden und das, im Gegensatz zur Arbeit von Ajith et al. an humanem Gewebe.

Gestützt auf die Ergebnisse von Ajith et al. könnte das Potential der COX-2-Inhibitoren Hydroxylradikale abfangen zu können, dem Ergebnis unserer Arbeit zugrunde liegen.

4.6 Vergleich antioxidativer Effekte der COX-2-Inhibitoren nach einfacher und mehrmaliger Vorinkubation

Nachdem die antioxidativen Effekte der COX-2-Inhibitoren Vioxx[®] und Celebrex[®] nach einmaliger Vorinkubation nachgewiesen wurden, erfolgte in einem zweiten Ansatz die Analyse möglicher kumulativer antioxidativer Effekte durch mehrmalige Inkubation der Substanzen. In diesem Ansatz wurden die Miniorgankulturen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 30min mit den entsprechenden Substanzen vorinkubiert.

Nach Vergleich der wiederholten Gabe mit der einmaligen Gabe der Präparate, zeigt sich für Celebrex[®], nach mehrfacher Vorinkubation, eine signifikant stärkere antioxidative Wirkung. Im Gegensatz konnte die mehrfache Inkubation mit Vioxx[®] keinen signifikanten kumulativen Effekt aufweisen.

In der Literatur wurden kumulative Effekte der Substanzen meist nur durch eine Verlängerung der Inkubationsintervalle untersucht. Chan et al. haben Zelllinien des nasopharyngealen Karzinoms sowohl mit unterschiedliche Dosen des COX-2-Inhibitors Celecoxib als auch in unterschiedlichen Intervallen (24, 48 und 72 Stunden) inkubiert. Das Ergebnis der Studie ergab eine gesteigerte Wachstumshemmung der Karzinomzellen bei verlängerter Inkubation (Chan et al., 2005).

Ebenso inkubierte Sievers et al. Zelllinien des Adenokarzinoms der Lunge in Intervallen von 24, 48 und 72 Stunden mit Celecoxib. Auch hier konnte zeitabhängig eine Inhibition der Zellproliferation ermittelt werden (Sievers et al., 2005).

Den Zusammenhang zwischen der p53 Expression und einer Inkubation mit Celecoxib in unterschiedlichen Intervallen untersuchte Swamy et al. an Kolonkarzinomzellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit Celecoxib in der Konzentration von 50µM bzw. 100µM, für 6, 12 und 24 Stunden. Es zeigte sich ein gesteigertes p53-Niveau nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 100µM (Swamy et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sind die antioxidativen Wirkungen der COX-2-Inhibitoren Vioxx[®] und Celebrex[®] nahezu gleich, jedoch zeigt die mehrfache Inkubation mit dem Präparat Vioxx[®] im Gegensatz zur mehrfachen Inkubation mit Celebrex[®] keinen kumulativen Effekt.

Auch Kazanov et al. konnten in ihren in vitro Untersuchungen einen Unterschied zwischen Celecoxib und Rofecoxib ermitteln. Diese Studie untersuchte gesunde Zelllinien und maligne transformierte Zelllinien von Kolonmukosa nach Inkubation mit Celecoxib und Rofecoxib und verglich das Tumorwachstum vor und nach Inkubation. Celecoxib war in der Lage das Wachstum mittels Apoptose transformierter Zellen zu hemmen. Im Gegensatz dazu stand Rofecoxib, welches auch bei maximaler Konzentration von 20µM keine Inhibition zeigte (Kazanov et al., 2004).

Obwohl beide COX-2-Inhibitoren die gleichen Eigenschaften bezüglich der antiinflammatorischen und analgetischen Wirkmechanismen haben, unterscheiden sie sich dennoch in ihren tumorprotektiven Eigenschaften. Neben Kazanov et al. zeigten

auch Waskewich et al., dass Celecoxib im Vergleich zu Rofecoxib die größte Effektivität in der Wachstumshemmung von hämatopoetischen und epithelialen Zelllinien hat (Waskewich et al., 2002).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte von beiden Wirkstoffen für Celecoxib eine stärkere antioxidative Wirkung im Vergleich zu Rofecoxib ermittelt werden.

Dennoch sollte Rofecoxib als potentielle Substanz im Rahmen einer Tumorthherapie nicht ganz außer Acht gelassen werden, denn es existieren zahlreiche in vivo Studien zur Effektivität von Rofecoxib (Oshima et al., 2001; Hallak et al., 2003). Generell scheint eine Diskrepanz zwischen in vitro und in vivo Studien zu bestehen. Während Celecoxib in vitro große Effektivität im Zusammenhang mit Tumorgenese zeigt, präsentiert Rofecoxib gute Ergebnisse in vivo. Die vorliegende Arbeit konnte in vitro bei beiden Präparaten signifikante antioxidative Effekte ermitteln, jedoch nur bei Celecoxib einen kumulativen Effekt.

5 Zusammenfassung

Die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes gilt aufgrund ihrer sehr exponierten Lage als erstes Kontaktorgan für DNA-schädigende Fremdstoffe. Diese DNA-Schädigung kann einen ersten Schritt in der Tumorgenese im Kopf-Hals-Bereich darstellen. Basierend hierauf wurde nasale Schleimhaut als Untersuchungsmaterial für die Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Die nasale Schleimhaut wurde zunächst zu Miniorganen kultiviert, die den Zellen Vitalität im Zellverband ermöglichten und somit eine in vivo Situation zumindest imitierten. Im Besonderen wurde durch den Einsatz von Miniorgankulturen eine wiederholte Inkubation mit DNA protektiven Substanzen und die Inkubation mit DNA schädigenden Substanzen, ermöglicht.

Nach Abschluss der siebentägigen Kultivierung konnten die Miniorgane dann mit den zu untersuchenden Präparaten Vioxx[®] und Celebrex[®] vorinkubiert werden. Dabei wurden initial genotoxische Effekte der beiden Präparate, sowohl nach einfacher wie auch nach mehrfacher Inkubation mittels der alkalischen Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) ausgeschlossen.

Um die effektivste Konzentration von Celebrex[®] zu ermitteln wurden zwei verschiedene Konzentrationen ausgewertet und bewiesen, dass Celebrex[®] in der Konzentration von 1µg/ml einen signifikant stärkeren antioxidativen Effekt aufweist als in der Konzentration 0,1µg/ml.

Nach Inkubation der Miniorgankulturen mit beiden Präparaten, sowohl einfach als auch mehrfach, erfolgte die genotoxische Schädigung mit H₂O₂.

Das Ergebnis des Comet Assays zeigte für beide COX-2-Inhibitoren einen signifikant antioxidativen, also DNA protektiven Effekt, für Celebrex[®] sogar einen potenzierten antioxidativen Effekt nach mehrfacher Inkubation.

Eine Beteiligung der COX-2 an verschiedensten Mechanismen der Karzinogenese und der mögliche Einsatz von COX-2-Inhibitoren in der Tumorprävention und Tumorthherapie wird basierend auf zahlreichen Studien diskutiert.

Bislang steht jedoch der Nachweis aus, dass COX-2-Inhibitoren an humaner Schleimhaut auch DNA protektive Eigenschaften besitzen, indem sie die DNA vor genotoxischen Schäden bewahren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben,

dass COX-2-Inhibitoren die Fähigkeit haben, die DNA humaner Zellen vor freien Radikalen zu schützen. Diesem Nachweis antioxidativen Potentials müssen klinische Studien folgen, die eine Effektivität und Verträglichkeit von COX-2-Hemmern in der Tumorprävention und – therapie untersuchen.

6 Literatur

1. Abou-Issa HM, Alshafie GA, Seibert K, Koki AT, Masferrer JL, Harris RE: Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis. *Anticancer Res* 21:3425-3432 (2001).
2. Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A: An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 54:1617-1621 (1994).
3. Ajith T, Subin JP, Jacob J, Sanjay PS, Babitha NV: Antimutagenic and anti-oxidant activities of the non-steroidal anti-inflammatory drug celecoxib. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:888-893 (2005).
4. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP: Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 79:380-389 (1997).
5. Altorki NK, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of cancers of the upper digestive tract. *Prog Exp Tumor Res* 37:107-123 (2003).
6. Balboa MA, Balsinde J: Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta* (2006).
7. Basu AK, Loechler EL, Leadon SA, Essigmann JM: Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7677-7681 (1989).

8. Bazan NG, Fletcher BS, Herschman HR, Mukherjee PK: Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5252-5256 (1994).
9. Bennett A, Carter RL, Stamford IF, Tanner NS: Prostaglandin-like material extracted from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 41:204-208 (1980).
10. Berenson JR, Yang J, Mickel RA: Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 4:1111-1116 (1989).
11. Boffetta P, Hashibe M: Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7:149-156 (2006).
12. Boiteux S, Radicella JP: The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377:1-8 (2000).
13. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ: Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520-8, 2 (2000).
14. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA: Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 352:1092-1102 (2005).
15. Califano J, van der RP, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-2492 (1996).

16. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y: Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res* 56:45-56 (1998).
17. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX: The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108:741-749 (2004).
18. Chan CM, Ma BB, Wong SC, Chan AT: Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S268-S271 (2005).
19. Chen PY, Long QC: Effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on biological traits of nasopharyngeal carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 25:943-949 (2004).
20. Clarkson PM, Thompson HS: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 72:637S-646S (2000).
21. Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD: Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:657-662 (1997).
22. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195-1214 (2003).
23. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 38:225-242 (2000).

24. DeWitt DL: Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 55:625-631 (1999).
25. Dixon DA: Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res* 37:52-71 (2003).
26. DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12:1063-1073 (1998).
27. Eling TE, Thompson DC, Foureman GL, Curtis JF, Hughes MF: Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:1-45 (1990).
28. FitzGerald GA: COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:879-890 (2003).
29. FitzGerald GA: Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 351:1709-1711 (2004).
30. Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR: Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 267:4338-4344 (1992).
31. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P: The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265:16737-16740 (1990).
32. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E: Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 3:53-61 (2001).

33. Geng Y, Blanco FJ, Cornelissson M, Lotz M: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* 155:796-801 (1995).
34. Glavac D, Volavsek M, Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Gale N: Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. *Cancer Genet Cytogenet* 146:27-32 (2003).
35. Gooch K, Culleton BF, Manns BJ, Zhang J, Alfonso H, Tonelli M, Frank C, Klarenbach S, Hemmelgarn BR: NSAID use and progression of chronic kidney disease. *Am J Med* 120:280-287 (2007).
36. Gupta RA, DuBois RN: Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1:11-21 (2001).
37. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A: Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:184-189 (1999).
38. Hallak A, Alon-Baron L, Shamir R, Moshkowitz M, Bulvik B, Brazowski E, Halpern Z, Arber N: Rofecoxib reduces polyp recurrence in familial polyposis. *Dig Dis Sci* 48:1998-2002 (2003).
39. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH: Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50:251-257 (2000).
40. Hamasaki Y, Eling TE: EGF and TPA stimulate de novo synthesis of PGHS-1 and PGHS-2 through different signal transduction pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53:225-229 (1995).

41. Hamilton LC, Mitchell JA, Tomlinson AM, Warner TD: Synergy between cyclo-oxygenase-2 induction and arachidonic acid supply in vivo: consequences for nonsteroidal antiinflammatory drug efficacy. *FASEB J* 13:245-251 (1999).
42. Hardisson D: Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260:502-508 (2003).
43. Harreus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: [Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie* 78:176-181 (1999).
44. Hecht SS: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1194-1210 (1999).
45. Hemler M, Lands WE: Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 251:5575-5579 (1976).
46. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S: Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95:1772-1783 (2003).
47. Hong JY, Yang CS: Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4:759-762 (1997).
48. Hughes AK, Padilla E, Kutchera WA, Michael JR, Kohan DE: Endothelin-1 induction of cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *Kidney Int* 47:53-61 (1995).

49. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR: Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5:127-135 (2005).
50. Isakson PC: Pharmacology of COX-2 inhibitors. *Prog Exp Tumor Res* 37:25-51 (2003).
51. Iwama T, Akasu T, Utsunomiya J, Muto T: Does a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (tiracoxib) induce clinically sufficient suppression of adenomas in patients with familial adenomatous polyposis? A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Int J Clin Oncol* 11:133-139 (2006).
52. Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroglu M: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 31:336-344 (2001).
53. Jefferies S, Foulkes WD: Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 37:115-126 (2001).
54. Johansson C, Kollberg B: Stimulation by intragastrically administered E2 prostaglandins of human gastric mucus output. *Eur J Clin Invest* 9:229-232 (1979).
55. Johnson N: Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 65:328-339 (2001).
56. Kam PC, See AU: Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55:442-449 (2000).
57. Kazanov D, Dvory-Sobol H, Pick M, Liberman E, Strier L, Choen-Noyman E, Deutsch V, Kunik T, Arber N: Celecoxib but not rofecoxib inhibits the growth of transformed cells in vitro. *Clin Cancer Res* 10:267-271 (2004).

58. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Ramonetti JT, Dannenberg AJ: Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 18:795-799 (1997).
59. Klaunig JE, Kamendulis LM: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:239-267 (2004).
60. Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harreus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63:141-147 (2001).
61. Kotelnikov VM, Coon JS, Taylor S, Hutchinson J, Panje W, Caldareill DD, LaFollette S, Preisler HD: Proliferation of epithelia of noninvolved mucosa in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 18:522-528 (1996).
62. Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ: Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol* 11:752-760 (2001).
63. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384:644-648 (1996).
64. Leung WK, To KF, Ng YP, Lee TL, Lau JY, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ: Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 84:335-339 (2001).
65. Mao H, Deng Z, Wang F, Harris TM, Stone MP: An intercalated and thermally stable FAPY adduct of aflatoxin B1 in a DNA duplex: structural refinement from 1H NMR. *Biochemistry* 37:4374-4387 (1998).

-
66. Marnett LJ: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370 (2000).
 67. Marnett LJ, Kalgutkar AS: Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol Sci* 20:465-469 (1999).
 68. Marnett LJ, Reed GA, Dennison DJ: Prostaglandin synthetase dependent activation of 7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-geno (a) pyrene to mutagenic derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 82:210-216 (1978).
 69. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, Erickson NL, Williams ME: Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:790-794 (1995).
 70. Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Dannenberg AJ: Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 57:2890-2895 (1997).
 71. Mitchell JA, Warner TD: Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 128:1121-1132 (1999).
 72. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist HB: Expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal dysplasia and carcinoma. *Acta Otolaryngol* 110:309-313 (1990).
 73. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O: Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 251:2629-2636 (1976).

-
74. Moraitis D, Du B, De Lorenzo MS, Boyle JO, Weksler BB, Cohen EG, Carew JF, Altorki NK, Kopelovich L, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ: Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. *Cancer Res* 65:664-670 (2005).
 75. Muller D, Millon R, Velten M, Bronner G, Jung G, Engelmann A, Flesch H, Eber M, Methlin G, Abecassis J: Amplification of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 33:2203-2210 (1997).
 76. Munroe DG, Lau CY: Turning down the heat: new routes to inhibition of inflammatory signaling by prostaglandin H2 synthases. *Chem Biol* 2:343-350 (1995).
 77. Narayanan BA, Narayanan NK, Pittman B, Reddy BS: Adenocarcinoma of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *Prostate* 66:257-265 (2006).
 78. O'Banion MK, Winn VD, Young DA: cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4888-4892 (1992).
 79. Olive PL, Banath JP: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294:275-283 (1993).
 80. Oshima M, Dinichuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM: Suppression of intestinal polyposis in *Apc* delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87:803-809 (1996).

81. Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF: Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 61:1733-1740 (2001).
82. Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298 (1984).
83. Ozgocmen S, Ardicoglu O, Erdogan H, Fadillioglu E, Gudul H: In vivo effect of celecoxib and tenoxicam on oxidant/ anti-oxidant status of patients with knee osteoarthritis. *Ann Clin Lab Sci* 35:137-143 (2005).
84. Partridge M, Gullick WJ, Langdon JD, Sherriff M: Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 26:381-389 (1988).
85. Picot D, Loll PJ, Garavito RM: The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367:243-249 (1994).
86. Poplawski T, Arabski M, Kozirowska D, Blasinska-Morawiec M, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Klupinska G, Jeziorski A, Chojnacki J, Blasiak J: DNA damage and repair in gastric cancer--a correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphisms. *Mutat Res* 601:83-91 (2006).
87. Rigas B, Goldman IS, Levine L: Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122:518-523 (1993).
88. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C: MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:504-507 (1996).

-
89. Sakurai K, Urade M, Noguchi K, Hashitani S, Takaoka K, Segawa E, Kishimoto H: Prognostic significance of cyclooxygenase-2 and DNA topoisomerase IIalpha expression in oral carcinoma. *Head Neck* 29:1002-1009 (2007).

 90. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, Panchal RG, Kerr IB, Mehta AR, Johnson NW, Deo MG: High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer* 63:573-578 (1991).

 91. Saunders MA, Belvisi MG, Cirino G, Barnes PJ, Warner TD, Mitchell JA: Mechanisms of prostaglandin E2 release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1101-1106 (1999).

 92. Schafer AI: Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 35:209-219 (1995).

 93. Schantz SP, Hsu TC: Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head Neck* 11:337-342 (1989).

 94. Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hölzel D: Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome. *Manual Kopf-Hals-Karzinome, Tumorzentrum München*:3-14 (2003).

 95. Scott LJ, Lamb HM: Rofecoxib. *Drugs* 58:499-505 (1999).

 96. Sheehan KM, O'Connell F, O'Grady A, Conroy RM, Leader MB, Byrne MF, Murray FE, Kay EW: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16:619-625 (2004).

-
97. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:431-434 (1991).
 98. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T: Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol* 33:608-614 (2002).
 99. Sievers EM, Bart RD, Backhus LM, Lin Y, Starnes M, Castanos R, Starnes VA, Bremner RM: Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibition in an orthotopic murine model of lung cancer for dose-dependent effect. *J Thorac Cardiovasc Surg* 129:1242-1249 (2005).
 100. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS: Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284:1247-1255 (2000).
 101. Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387-437 (2004).
 102. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191 (1988).
 103. Sliwinski T, Rozej W, Morawiec-Bajda A, Morawiec Z, Reiter R, Blasiak J: Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res* 634:220-227 (2007).

104. Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101:1323-1331 (1991).
105. Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD, Audoly LP: The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest* 107:325-331 (2001).
106. Stroebel M, Goppelt-Struebe M: Signal transduction pathways responsible for serotonin-mediated prostaglandin G/H synthase expression in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 269:22952-22957 (1994).
107. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q: Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 20:2125-2129 (1999).
108. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ: Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274:10911-10915 (1999).
109. Swamy MV, Herzog CR, Rao CV: Inhibition of COX-2 in colon cancer cell lines by celecoxib increases the nuclear localization of active p53. *Cancer Res* 63:5239-5242 (2003).
110. Tetradis S, Pilbeam CC, Liu Y, Kream BE: Parathyroid hormone induces prostaglandin G/H synthase-2 expression by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway in the murine osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Endocrinology* 137:5435-5440 (1996).
111. Tomisato W, Tsutsumi S, Hoshino T, Hwang HJ, Mio M, Tsuchiya T, Mizushima T: Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem Pharmacol* 67:575-585 (2004).

-
112. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H: Glutathione s-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 170:499-501 (1995).
 113. Tsujii M, DuBois RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83:493-501 (1995).
 114. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3336-3340 (1997).
 115. Tunes I, Munoz MC, Villavicencio MA, Medina FJ, de Prado EP, Espejo I, Barcos M, Salcedo M, Feijoo M, Montilla P: Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res* 52:223-228 (2005).
 116. Turini ME, DuBois RN: Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 53:35-57 (2002).
 117. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J: Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266:37-56 (2004).
 118. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40 (2006).
 119. Vogelstein B, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141 (1993).
 120. Walker MC, Kurumbail RG, Kiefer JR, Moreland KT, Koboldt CM, Isakson PC, Seibert K, Gierse JK: A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of

- cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochem J* 357:709-718 (2001).
121. Wallner BC, Harreus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH: [Genotoxicity studies in mini-organ cultures of human nasal mucosa]. *HNO* 53:1037-1046 (2005).
122. Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J: Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res* 62:2029-2033 (2002).
123. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146 (1991).
124. Weitzman SA, Gordon LI: Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76:655-663 (1990).
125. Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Schoenberg JB, Fraumeni JF, Jr.: Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 51:3044-3047 (1991).
126. Winterbourn CC: Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic Biol Med* 14:85-90 (1993).
127. Xie W, Herschman HR: Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 271:31742-31748 (1996).
128. Yan BM, Leung YP, Urbanski SJ, Myers RP: Rofecoxib-induced hepatotoxicity: A forgotten complication of the coxibs. *Can J Gastroenterol* 20:351-355 (2006).

129. Yokota J, Sugimura T: Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J* 7:920-925 (1993).

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
ca.	circa
°C	Grad Celsius
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
FCS	Fötales Kälberserum
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphate buffered saline
V	Volt

7.2 Publikation

Matthias C., Schuster MT, Zieger S., Harreus U.:

COX-2 inhibitors Celecoxib and Rofecoxib prevent oxidative DNA fragmentation.

Anticancer Research 26: 2003-2008 (2006)

7.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München und ihrem ärztlichen Direktor, Herrn Professor Dr. med. A. Berghaus für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und für die freundliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. U. Harréus, der großen Wert auf eine außerordentlich gute Betreuung legte und während der gesamten Arbeit stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand. Vielen Dank für die Einführung in die Thematik und die zahlreichen Anregungen. Weiterhin möchte ich mich für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel für die Durchführung dieser Arbeit und die Durchsicht des Textes ganz herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. med. C. Matthias für die freundliche Unterstützung.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. med. M. Reiter für die Durchsicht des Textes.

Mein herzlichster Dank gilt auch Frau S. Zieger für die Einführung in die Methodik und die immerwährende und außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft. Vielen Dank für die Vielzahl an Anregungen, für das stets offene Ohr und die freundschaftliche Unterstützung.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie großen Dank aussprechen. Nur mit Hilfe ihrer Liebe, ihrem unermüdlichen Einsatz, ihrer unendlichen Geduld und schließlich ihres großen Vertrauens in meine Leistungen, ist die Verwirklichung dieser Arbeit möglich geworden.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname/Nachname:	Marie-Therese, Schuster
Geburtstag/-ort:	20.11.1980, München
Wohnort:	80686 München, Endelhauserstraße 27
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Hochschulstudium und Schulbildung

11/2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 – 01/2008	Studium der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität in München
09/1991 – 06/2000	Städtisches Thomas-Mann-Gymnasium in München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/1987 – 07/1991	Grundschule an der Herterichstraße in München

Dissertation

04/2004 – 06/2009	Thema: „Die antioxidative Wirkung von Cyclooxygenase-2-Inhibitoren gemessen an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut“ Labor der klinisch/experimentellen Onkologie, Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität München
-------------------	---

Publikation

04/2006	Matthias C, Schuster MT, Zieger S, Harreus U: COX-2 Inhibitors Celecoxib and Rofecoxib prevent oxidative DNA fragmentation. Anticancer Research 26: 2003-2008 (2006)
---------	--

Klinische Tätigkeit

Seit 02/2008	Assistenzärztin am Klinikum Kaufbeuren Ostallgäu Medizinische Klinik II
--------------	--